WYKORZYSTANIE METOD SPEKTROSKOPOWYCH DO OZNACZANIA SUBSTANCJI LECZNICZYCH

pod redakcją Tomasza Pawińskiego

WYKORZYSTANIE METOD SPEKTROSKOPOWYCH DO OZNACZANIA SUBSTANCJI LECZNICZYCH

pod redakcją Tomasza Pawińskiego

WARSZAWSKI
UNIWERSYTET
MEDYCZNY

Warszawa 2026

Autorzy

Dr Magdalena Bodnar-Broniarczyk
Dr Monika Franczak-Rogowska
Dr Anna Goldnik
Dr Arkadiusz Kocur
Dr Dorota Marszałek
Dr Elżbieta Pirianowicz-Chaber
Dr Marzanna Strupińska
Dr Iwona Szlaska
Dr Iwona Winiecka

Recenzenci

prof. dr hab. Joanna Kolmas – Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej i Biomateriałów WUM

dr hab. Katarzyna Paradowska – Katedra i Zakład Chemii Organicznej i Fizycznej WUM

Wydano za zgodą Uczelnianej Rady ds. Kształcenia WUM

ISBN 978-83-7637-682-0

Wydano w Sekcji Druków Uczelnianych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
tel. (22) 57 20 329, e-mail: wydawnictwo@wum.edu.pl
www.drukiuczelniane.wum.edu.pl

Spis treści

Przedmowa 5

1. Metody spektroskopowe [1–7] 7
   1.1. Spektrofotometria UV – Vis 8
   1.2. Spektrofotometria w świetle UV – monografie szczegółowe 15
   1.3. Spektrofotometria w świetle Vis – monografie szczegółowe 38
2. Metoda spektrofluorymetryczna [17–23] 61
   2.1. Spektrofluorymetria – monografie szczegółowe 68
3. Teoretyczne podstawy walidacji metod spektralnych [23–26] 74
4. Piśmiennictwo 81

Przedmowa

Gdy w połowie XVIII wieku Izaak Newton rozszczepił światło słoneczne za pomocą pryzmatu nazywając to zjawisko „spektrum” udowodnił, że białe światło składa się z promieni słonecznych o różnej długości fali, inaczej barw tęczy. Nikt włącznie z wybitnym Odkrywcą nie przypuszczał wówczas jak wszechstronne zastosowanie znajdzie to odkrycie. Dziś wykorzystywane jest ono w zaawansowanych technikach analitycznych. Przyczyniły się do tego wynalazki XX wieku i rozwój teorii kwantowej. Najpierw Niels Bohr przedstawił model atomu tłumacząc powstawanie widm emisyjnych i absorpcyjnych, co dało podwaliny pod spektroskopię teoretyczną. W połowie lat 50-tych ubiegłego wieku skonstruowano pierwsze spektrofotometry UV-VIS do przeprowadzania pomiarów w ultrafiolecie i świetle widzialnym. Kolejne etapy rozwoju metod spektralnych to spektroskopia w podczerwieni IR i rezonansu magnetycznego NMR, które umożliwiły badanie struktury związków organicznych. Natomiast wynalezienie lasera umożliwiło rozwój spektroskopii ramanowskiej wykorzystującej zjawisko rozproszenia światła, a techniki łączenia metod spektroskopowych z metodami chromatograficznymi doprowadziły do opracowania metod umożliwiających analizę śladową zarówno w materiale pochodzącym z otaczającego nas środowiska, jak również w materiale biologicznym pochodzącym z organizmu ludzkiego, stając się narzędziem niezbędnym we współczesnej diagnostyce. Oddając do rąk studentów to opracowanie w postaci krótkiego skryptu, autorzy mają nadzieję przybliżenia czytelnikom aktualnej wiedzy dotyczącej wykorzystania metod spektroskopowych w oznaczaniu substancji leczniczych.

1. Metody spektroskopowe [1–7]

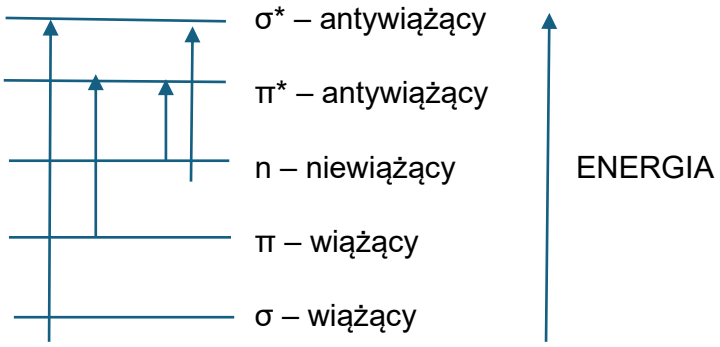
Spektroskopia jest najczęściej stosowaną techniką instrumentalną, która zajmuje się pomiarem i interpretacją widm absorpcji, emisji lub rozproszenia promieniowania elektromagnetycznego w różnych zakresach jego energii i długości fali.
Jest to metoda analityczna, która polega na analizie widm powstających w wyniku oddziaływania promieniowania elektromagnetycznego z materią. Próbka poddawana badaniu selektywnie absorbuje promieniowanie, dzięki czemu można dokładnie oznaczyć ilościowo występujące w niej związki z odpowiednią stabilnością. W zależności od zakresu zastosowanego promieniowania elektromagnetycznego możemy wykorzystać różne techniki analityczne np.:

- magnetyczny rezonans jądrowy (NMR) – fale radiowe – powyżej 1 m,
- elektronowy rezonans para magnetyczny (EPR) – mikrofale – od 1m do 1 mm,
- spektrofotometria w podczerwieni – podczerwień – od 1 mm do 700 nm,
- spektroskopia Ramana – podczerwień – od 1 mm do 700 nm,
- spektrofotometria Vis – widzialne – od 700 nm do 380 nm,
- spektrofluorymetria – widzialne – od 700 nm do 380 nm,
- spektrofotometria UV – nadfiolet – od 380 nm do 10 nm,
- absorpcyjna spektroskopia atomowa – nadfiolet – od 380 nm do 10 nm,
- emisyjna spektroskopia atomowa – nadfiolet – od 380 nm do 10 nm,
- rentgenowska spektroskopia absorpcyjna – promieniowanie rentgenowskie – od 10 nm do 5 pm,
- rentgenowska spektroskopia emisyjna – promieniowanie rentgenowskie – od 10 nm do 5 pm,
- spektroskopia fluorescencji rentgenowskiej – promieniowanie rentgenowskie – od 10 nm do 5 pm,
- rentgenowska spektroskopia fotoelektronów – promieniowanie rentgenowskie – od 10 nm do 5 pm,
- analiza aktywacyjna – promieniowanie gamma – poniżej 5 pm.

W poniższym skrypcie omówione zostaną preparaty, do oznaczania których wykorzystano promieniowanie elektromagnetyczne w zakresie widzialnym i nadfiolecie.

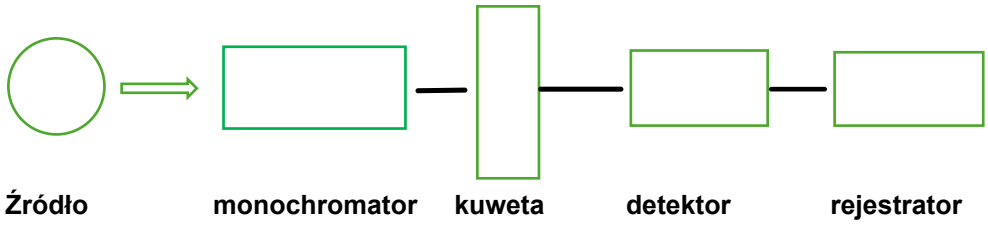
1.1. Spektrofotometria UV – Vis

To jedna z najstarszych metod instrumentalnych stosowanych w analizie zarówno jakościowej jak i ilościowej. Opiera się na badaniu przejść elektronowych pomiędzy różnymi stanami energetycznymi, a właściwie absorpcji promieniowania koniecznego do przejść pomiędzy stanem energetycznym o niższej energii na wolny orbital o wyższej energii.



Rysunek 1. Możliwe przejścia w związkach organicznych

Absorpcja promieniowania w zakresie 700 nm – 10 nm wiąże się z przejściami elektronów walencyjnych σ, π i elektronów stanowiących wolne pary elektronowe (patrz rys. 1). Przejścia typu σ→σ* obserwujemy najczęściej w zakresie UV, a przejścia typu π→π* charakteryzuje największa intensywność w zakresie UV-Vis.
Efektem absorpcji i przedmiotem badań jest elektronowe widmo absorpcyjne.
Do ww. pomiarów niezbędna jest odpowiednia aparatura, której schemat blokowy przedstawiono poniżej.



Rysunek 2. Uproszczony schemat blokowy budowy spektrofotometru

Spektrofotometr to urządzenie laboratoryjne, którego działanie opiera się na pomiarze ilości światła absorbowanego przez badaną próbkę (patrz rys. 2). Widmo powstaje na skutek oddziaływania promieniowania na substancję. Źródłem promieniowania mogą być lampy deuterowe (180–380 nm), lampy wolframowo-halogenowe (zakres światła widzialnego i bliskiej podczerwieni) oraz łukowe lampy ksenonowe wysokociśnieniowe (cały zakres UV-Vis). Wiązka światła ze źródła przechodzi przez siatkę dyfrakcyjną lub pryzmat, którego zadaniem jest wyizolowanie promieniowania

o wybranej długości fali. Następnie wiązka przechodzi przez kuwetę z roztworem badanym i kierowana jest do detektora. Pomiar absorbancji przez cząsteczki promieniowania ultrafioletowego to zakres od 200–380 nm, a widzialnego to zakres od 380–750 nm. Dzięki temu możliwe jest oznaczanie stężenia oraz obecności różnych substancji chemicznych. Absorpcja promieniowania z zakresu UV lub Vis powoduje przejście elektronu z wiążącego orbitalu molekularnego o niższej energii na orbital antywiążący o wyższej energii. Badanie rozpoczyna się wykreśleniem widma w zakresie UV lub Vis i wyborem analitycznej długości fali. W ten sposób zostaje przeprowadzona analiza spektrofotometryczna. Pozwala ona oznaczyć obecność i stężenie substancji nieorganicznych i organicznych w próbkach trudnych do zaabsorbowania przy zastosowaniu innych metod. Analizę spektrofotometryczną wykonuje się w rutynowych badaniach w chemii analitycznej. Jest ona wykorzystywana głównie do analizy struktury związków organicznych. Za jej pomocą można oznaczyć ilościowo różne związki w tym, m.in. silnie sprzężone związki organiczne, makromolekuły biologiczne, roztwory, ale także ciała stałe i gazy. Czułość metody pozwala na bardzo dokładne oznaczenie stężenia substancji organicznych i nieorganicznych. Spektrofotometria jako technika jest często wykorzystywana do pomiarów czystości wody, z jej pomocą można uzyskać informacje na temat różnych parametrów, m.in.: zawartości chlorków, żelaza, krzemionki, manganu, ale także twardości wody. Spektrofotometrycznie sprawdza się również poziom zanieczyszczenia zbiorników wodnych. Ta technika pozwala także na badanie zawartości składników mineralnych oraz toksyn w materiałach biologicznych – np. w żywności. Znanych jest bardzo wiele metod ilościowego oznaczania białek, różniących się czułością i wykorzystujących takie właściwości tej grupy związków jak: zawartość azotu, zdolność do absorpcji światła w zakresie UV, tworzenie chemicznych pochodnych oraz wiązanie barwników. Metoda obarczona może być błędem rzędu 5–10%, a w przypadku analiz śladowych nawet do 30%. Czułość metod dla niektórych oznaczeń może osiągać wartość poniżej 1 μg/ml.

Analiza ilościowa metodą spektrofotometrii UV-Vis opiera się na pomiarze absorbancji badanego roztworu przy określonej długości fali opartej na zależności Lamberta-Beera.

Prawa absorpcji

I prawo absorpcji (prawo Lamberta)

$$A = k \cdot l \cdot c$$

gdzie: A – absorbancja
k – współczynnik absorpcji
l – grubość warstwy
c – stężenie substancji absorbującej

„Absorbancja jest proporcjonalna do grubości warstwy absorbującej, jeżeli wiązka promieniowania monochromatycznego przechodzi przez jednorodny ośrodek absorbujący”.

II prawo absorpcji (prawo Lamberta-Beera)

Według II prawa absorpcji występuje zależność absorbancji od stężenia substancji absorbującej w roztworze (zakładając, że współczynnik absorpcji rozpuszczalnika jest równy zero), przy zachowaniu stałej grubości warstwy. Absorbancja zależy zarówno od grubości warstwy jak i stężenia substancji absorbującej.

$$A = a \cdot l \cdot c$$

gdzie: *A* – absorbancja
a – właściwy współczynnik absorpcji w przypadku, gdy stężenie wyrażamy w g ·mL^{-1} lub kg · L^{-1}
l – grubość warstwy

Gdy stężenie *c* wyrażamy w mol · L^{-1} wówczas równanie przybiera postać:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

gdzie: $\boldsymbol{\varepsilon}$ – molowy współczynnik absorpcji, jednostką jest [L · mol^{-1} · cm^{-1}]

stąd: $\boldsymbol{\varepsilon} = \frac{A}{c \cdot l}$ [L · mol^{-1} · cm^{-1}]

Jeżeli stężenie będzie wyrażone w mol/L ((mol^{-1}) l cm^{-1}). Ten współczynnik nosi nazwę molowego współczynnika absorpcji **ε.** Jest to miara absorbancji roztworu o stężeniu mol/L znajdującego się w kuwecie o grubości warstwy 1 cm.
Jeżeli stężenie wyrazimy w % objętościowych (g/100 cm^3) to współczynnik *k* nosi nazwę absorbancji właściwej:

$$\frac{A1\%}{1\ cm} \text{ lub a } \frac{1\%}{1\ cm}$$

Jest miarą absorbancji roztworu o stężeniu 1% i objętości roztworu w kuwecie o grubości warstwy 1 cm.
Molowy współczynnik absorpcji jest ważnym parametrem, gdyż opisuje widmo elektronowe oraz intensywność absorpcji promieniowania.
Jeżeli rozpuszczalnik nie absorbuje promieniowania w badanym zakresie długości fal to absorbancja wiązki promieniowania przechodzącego przez jednorodny roztwór jest wprost proporcjonalna do stężenia roztworu (c) i grubości warstwy absorbującej (l).
Jeżeli roztwór spełnia II prawo absorpcji, wówczas zależność absorbancji od stężenia jest linią prostą przechodzącą przez początek układu współrzędnych.

III prawo absorpcji (prawo addytywności absorpcji)

Prawo to opisuje mieszaniny roztworów i przedstawia absorbancję roztworów wieloskładnikowych jako sumę absorbancji pojedynczych składników mieszaniny.

$$A = A1 + A2 + \cdots + An$$

gdzie: *A* – absorbancja wszystkich składników,
A1+A2+...+An – absorbancje poszczególnych składników.

Przyczyny odchyleń od praw absorpcji

Zgodnie z prawem Lamberta-Beera zależność absorbancji od stężenia roztworu, jest linią prostą przechodzącą przez początek układu. Odchylenia od praw absorpcji mogą być wywoływane przez:

– ograniczenia praw

Prawa absorpcji są spełnione dla roztworów rozcieńczonych w zakresie ($c < 0{,}01$ mol $\cdot$ l^{-1}) lub w niektórych przypadkach silnie rozcieńczonych ($c < 0{,}001$ mol $\cdot$ l^{-1}). W takich roztworach molowy współczynnik absorpcji nie zależy od współczynnika załamania światła. W przypadku roztworów stężonych występuje taka zależność.

Zakładamy również, że jedynym efektem oddziaływania promieniowania na roztwór substancji jest absorpcja promieniowania. Jednak powrót cząsteczki do stanu podstawowego ze stanu wzbudzonego powoduje emisję kwantu promieniowania, które dociera do detektora powodując, że zmierzona absorbancja będzie niższa od rzeczywistej. Dlatego przed przystąpieniem do oznaczeń ilościowych należy sprawdzić, w jakim zakresie stężeń zależność *A = f(c)* jest prostoliniowa.

– czynniki chemiczne

Odchylenia od praw absorpcji są również spowodowane reakcjami zachodzącymi w analizowanych roztworach. Zmiana stężenia lub pH roztworu może być przyczyną reakcji dysocjacji, solwatacji, asocjacji, kompleksowania i polimeryzacji, co ma znaczący wpływ na właściwości optyczne badanych roztworów.

– czynniki aparaturowe

Przyczyną odstępstw od praw absorpcji, związanych z czynnikami aparaturowymi może być brak monochromatyczności promieniowania lub występowanie promieniowania rozproszonego (występuje w aparatach niższej klasy).

Oznaczanie pojedynczego składnika:

1. Metoda porównywania z pojedynczym wzorcem. Mierzymy absorbancję A_x roztworu badanego c_x i absorbancję A_s roztworu wzorcowego o znanym stężeniu c_s przy tej samej długości fali oraz w kuwetach o tej samej grubości *b*.
Zmierzone absorbancje można wyrazić wzorem:

$$A_x = \varepsilon_\lambda \cdot c_x \cdot b$$

$$A_s = \varepsilon_\lambda \cdot c_s \cdot b$$

Dzieląc równania stronami otrzymujemy:

$$\frac{\boldsymbol{Ax}}{\boldsymbol{As}} = \frac{\boldsymbol{cx}}{\boldsymbol{cs}}$$

a stąd: $c_x = \frac{Ax}{As} c_s$

gdzie: (A_x) – absorbancja roztworu badanego c_x
(A_s) – absorbancja roztworu wzorcowego o znanym stężeniu c_s.

2. Metoda porównawcza z kilkoma wzorcami – krzywa wzorcowa. Jest to metoda uniwersalna w oznaczeniach instrumentalnych.
Polega ona na wykreśleniu krzywej wzorcowej zależności absorbancji od wzrastającego znanego stężenia i wykorzystanie jej do odczytu zawartości substancji w próbce o nieznanym stężeniu na podstawie odczytanej wartości absorpcji. Pomiary do krzywej wzorcowej i próbki badanej prowadzone są przy tej samej długości fali i w kuwetach o tej samej grubości i z tego samego materiału.

3. Metoda dodatku wzorca – wykonujemy pomiar absorbancji (A_0) próbki badanej o określonym stężeniu c_x i absorbancji (A_I) próbki badanej o stężeniu $\boldsymbol{c_x}$ z dodatkiem wzorca o stężeniu $\boldsymbol{c_s}$. Metoda ta może być stosowana wyłącznie w przypadku, gdy występuje prostoliniowa zależność A do **c**.

Wyróżniamy: metodę jednokrotnego dodatku wzorca, w której stężenie analizowanej próbki obliczamy według wzoru.

$$c_X = \frac{A0 \cdot cs}{AI - A0}$$

gdzie: (A_0) absorbancja próbki badanej o określonym stężeniu c_x
(A_I) absorbancja próbki badanej o stężeniu $\boldsymbol{c_x}$ z dodatkiem wzorca o stężeniu c_s

oraz metodę wielokrotnego dodawania wzorca, w której stężenie analizowanej próbki odczytujemy z krzywej wzorcowej.

Oznaczanie składników w mieszaninach dwu i wieloskładnikowych:
Stosując metodę spektrofotometrii UV-Vis możemy oznaczyć stężenie składników w mieszaninach dwu- i wieloskładnikowych. Aby oznaczyć dwa składniki występujące równocześnie to prawo Lamberta-Beera musi być spełnione w wybranym zakresie długości fali i stężeń. To samo dotyczy prawa addytywności absorpcji. Ponadto musi być spełniony warunek, że obydwa składniki mieszaniny muszą umożliwiać wybór dwóch długości fali, przy których raz dominuje absorbancja jednego składnika

a raz drugiego. Rozdział jest możliwy, jeśli spełniony jest warunek braku innych związków absorbujących. Liczba analitycznych długości fali musi być co najmniej równa liczbie oznaczanych składników, z których można ułożyć układ równań. Grubość warstwy wynosi 1 cm. Otrzymamy:

$$A_{\lambda 1} = (\varepsilon_x \cdot c_x + \varepsilon_y \cdot c_y) * l$$

$$A_{\lambda 2} = (\varepsilon'_x \cdot c_x + \varepsilon^1_y \cdot c_y) * l$$

gdzie: ε_x i ε'_x – to molowe współczynniki absorpcji substancji X przy λ_1 i λ_2
ε_y i ε'_y – to molowe współczynniki absorpcji substancji Y przy λ_1 i λ_2

Równania te rozwiązujemy względem c_x i c_y.

$$C_x = \frac{\mathbf{A\lambda 1}\ \varepsilon' y - \mathbf{A\lambda 2}\ \varepsilon y}{\varepsilon x\ \varepsilon' y - \ \varepsilon' x \varepsilon y}$$

$$C_y = \frac{\mathbf{A\lambda 2}\ \varepsilon' y - \mathbf{A\lambda 2}\ \varepsilon y}{\varepsilon x\ \varepsilon' y - \ \varepsilon' y \varepsilon x}$$

Z równania wynika, że należy obliczyć wartości molowych współczynników absorpcji dla substancji X i Y przy λ_1 i λ_2. Odnosimy to do krzywych absorpcji, które sporządzamy na podstawie znanego stężenia oznaczanych substancji.
Analogicznie możemy przeanalizować mieszaniny wieloskładnikowe.
W 1 przypadku krzywe absorpcji nie nakładają się i dlatego możliwe jest oznaczenie bezpośrednio dwóch składników A_1 λ i A_2λ.
W 2 przypadku można bezpośrednio oznaczyć składnik Y przy λ_2, gdyż składnik X przy tej długości fali nie przeszkadza. Jeżeli znamy przebieg krzywych absorpcji składników X i Y to możliwe jest dobranie długości fali λ_2 w taki sposób, aby absorpcja składnika Y w punkcie λ_2 była równa absorpcji tego składnika w punkcie λ_1.

Miareczkowanie spektrofotometryczne

Spektrofotometria UV-Vis jest metodą instrumentalną, która może być stosowana do wyznaczenia punktu końcowego miareczkowania. Pomiar polega na mierzeniu absorbancji analizowanej próbki po dodaniu kolejnych porcji odczynnika miareczkującego. Wykres sporządza się w układzie A = f (V) gdzie V jest objętością roztworu miareczkującego. Punk końcowy miareczkowania można wyznaczyć wobec wskaźnika jak i bez indykatora.

Obliczenia w spektrofotometrii:

1. Molowy współczynnik absorpcji roztworu jest znany lub może być wyznaczony z roztworu standardowego.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad \rightarrow \quad c = A/\varepsilon \cdot l$$

2. Według proporcji absorbancji roztworu o znanym lub nieznanym stężeniu

$$\frac{Abad}{Ast} = \frac{\varepsilon \cdot \text{c bad} \cdot \text{c l}}{\varepsilon \cdot \text{c} \cdot \text{l}} = C_{bad} = \frac{A\ bad}{Ast} \cdot C_{st}$$

3. Z krzywej kalibracyjnej dla badanego zakresu stężeń *Y = f(c)*

Przykład

Odważkę substancji zawierającą 1,9 mg rozpuszczono w metanolu w kolbie miarowej o pojemności 50 cm^2. Następnie wykreślono widmo w kuwecie o grubości 1cm. Otrzymano widmo λ_{max} = 264 nm i A = 0,724.

Następnie obliczamy absorbancję właściwą.

0,0019 g – w 50 mL
x – w 100 mL

c = 0,0038 g

c = 0,0038 (g/mL) = 0,0038 (% obj.)

$\frac{A1\%}{1\ cm} = \frac{0,724}{0,0038 \cdot 1}$ = 190,52

4. Obliczając absorbancję roztworu, który ma przepuszczalność T (%) = 92% przy długości fali = 400 nm.

%T = T· 100

T = 92%/ 100 = 0,92

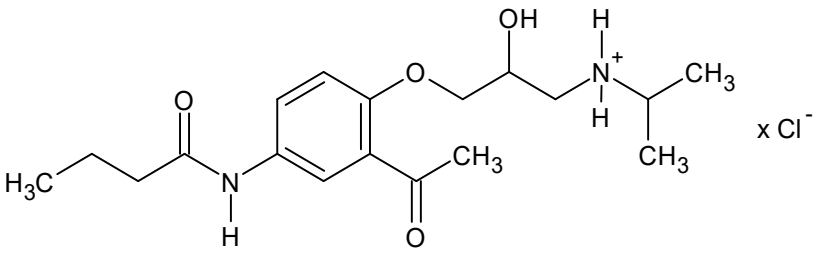
A = - log (T)

A = - log (0,92)

A= 0,0362

1.2. Spektrofotometria w świetle UV – monografie szczegółowe

ACEBUTOLOLU CHLOROWODOREK



$C_{18}H_{29}N_2O_4Cl$ m.cz. 372,9

Chlorowodorek N-[3-acetylo-4-[2-hydroksy-3-(propan-2-yloamino)propoksy]-fenylo]butanamidu

Wyznaczenie analitycznej długości fali

Odważyć dokładnie ok. 0,1 g substancji wzorcowej do kolby miarowej poj. 100,0 mL i rozpuścić w 0,1 mol/L HCl (roztwór podstawowy). Z roztworu pobrać 2,0 mL i uzupełnić do 100,0 mL 0,1 mol/L HCl. Wyznaczyć analityczną długość fali w zakresie 200–400 nm.

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Z roztworu podstawowego pobrać odpowiednio:

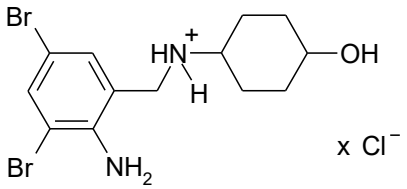
1. 1,0 mL
2. 1,5 mL
3. 2,0 mL
4. 2,5 mL
5. 3,0 mL

i uzupełnić roztwory 0,1 mol/L HCl do 100,0 mL. Wykreślić krzywą wzorcową wobec 0,1 mol/L HCl jako odnośnika.

Oznaczenie preparatu o nieznanej zawartości

Odważyć dokładnie ok. 0,1 g substancji badanej i uzupełnić do 100,0 mL 0,1 mol/L HCl. Pobrać z tego roztworu 2,0 mL i uzupełnić do 100,0 mL 0,1 mol/L HCl. Zmierzyć absorbancję i odczytać zawartość z krzywej wzorcowej.

AMBROKSOLU CHLOROWODOREK



$C_{13}H_{19}Br_2ClN_2O$ m.cz. 414,6

Chlorowodorek 4-(2-amino-3,5-dibromobenzyloamino)cykloheksanolu

Wyznaczenie analitycznej długości fali

Odważyć dokładnie ok. 0,10 g substancji wzorcowej do kolby miarowej poj. 100,0 mL i rozpuścić ogrzewając na łaźni wodnej w 0,1 mol/L HCl (roztwór podstawowy). Z roztworu pobrać 10,0 mL i uzupełnić 0,1 mol/L HCl do 100,0 mL. Wykreślić widmo w zakresie od 200-400 nm. Wybrać analityczną długość fali do dalszych oznaczeń.

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Z roztworu podstawowego pobrać odpowiednio:

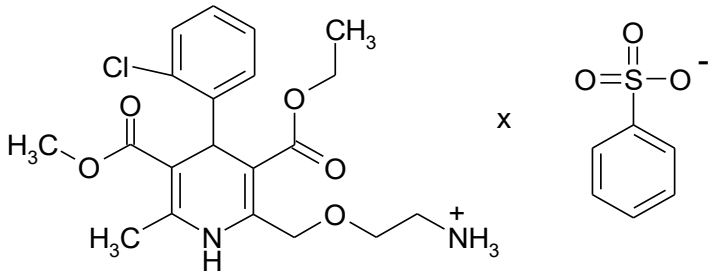
1. 0,5 mL
2. 1,0 mL
3. 2,0 mL
4. 4,0 mL
5. 6,0 mL

i uzupełnić każdy wymieniony roztwór 0,1 mol/L HCl do 50,0 mL. Wykreślić krzywą wzorcową stosując 0,1 mol/L HCl jako odnośnik.

Oznaczanie preparatu o nieznanej zawartości.

Odważyć dokładnie ok. 0,10 g substancji badanej do kolby miarowej poj. 100,0 mL i rozpuścić ogrzewając na łaźni wodnej w 0,1 mol/L HCl. Z roztworu pobrać 3,0 mL i uzupełnić 0,1 mol/L HCl do 50,0 mL. Zmierzyć absorbancję i odczytać zawartość z krzywej wzorcowej. [8]

AMLODYPINY BEZYLAN



$C_{26}H_{31}ClN_2O_8S$ m.cz. 567,1

Benzenosulfonian 2-[(2-aminoetoksy)-metylo]-4-(2-chlorofenylo)-6-metylo-1,4-dihydropirydyno-3,5-dikarboksylanu 3-etylu-5-metylu

Wyznaczenie analitycznej długości fali

Odważyć dokładnie ok. 0,05 g bezylanu amlodypiny, a następnie substancję przenieść ilościowo do kolby miarowej o pojemności 50,0 mL (roztwór podstawowy), i rozpuścić w metanolu. Z tak przygotowanego roztworu pobrać 1,0 mL, przenieść do kolby miarowej o pojemności 50,0 mL i uzupełnić metanolem. Wykreślić widmo w zakresie 200–400 nm,

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Z roztworu podstawowego pobrać odpowiednio:

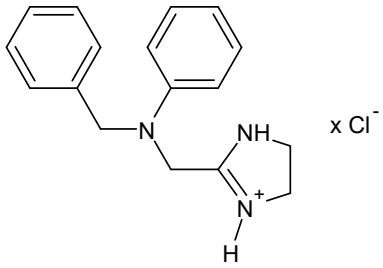
1. 0,10 mL
2. 0,25 mL
3. 0,50 mL
4. 0,75 mL
5. 1,00 mL

i uzupełnić metanolem do 50,0 mL. Dokonać pomiaru absorpcji przy wyznaczonej długości fali. Wykreślić krzywą wzorcową wobec metanolu jako odnośnika.

Oznaczanie preparatu o nieznanej zawartości.

Odważyć dokładnie ok. 0,05 g substancji badanej do kolby miarowej poj. 50,0 mL i rozpuścić w metanolu. Z roztworu pobrać 0,5 mL i uzupełnić metanolem do 50,0 mL. Zmierzyć absorbancję i odczytać zawartość z krzywej wzorcowej. [9]

ANTAZOLINY CHLOROWODOREK



$C_{17}H_{20}ClN_3$ m.cz. 301,8

Chlorowodorek N-benzylo-N-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-ilometylo)aniliny

Wyznaczenie analitycznej długości fali

Odważyć dokładnie ok. 0,1 g substancji wzorcowej do kolby miarowej o poj. 100,0 mL i rozpuścić w 0,1 mol/L HCl (roztwór podstawowy). Z roztworu pobrać 1,0 mL i uzupełnić do 50,0 mL 0,1 mol/L HCl. Wyznaczyć analityczną długość fali w zakresie 200–400 nm.

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Z roztworu podstawowego pobrać odpowiednio:

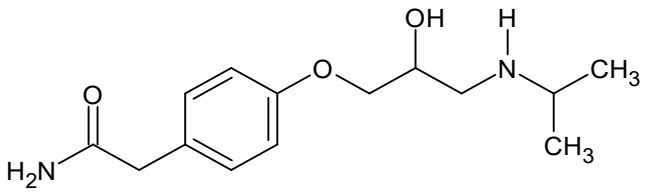
1. 0,20 mL
2. 0,40 mL
3. 0,60 mL
4. 0,80 mL
5. 1,00 mL

i uzupełnić 0,1 mol/L HCl do 50,0 mL. Wykreślić krzywą wzorcową wobec 0,1 mol/L HCl jako odnośnika.

Oznaczenie preparatu o nieznanej zawartości

Odważyć dokładnie ok. 0,1 g substancji badanej i uzupełnić do 100,0 mL 0,1 mol/L HCl. Pobrać z tego roztworu 0,6 mL i uzupełnić do 50,0 mL. Zmierzyć absorbancję i odczytać zawartość z krzywej wzorcowej.

ATENOLOL



$C_{14}H_{22}N_2O_3$ m.cz. 266,3

2-[4-[2-Hydroksy-3-(propan-2-yloamino)propoksy]fenylo]acetamid

Wyznaczenie analitycznej długości fali

Odważyć dokładnie ok. 0,1 g substancji wzorcowej do kolby miarowej o poj. 100,0 mL i rozpuścić w 0,1 mol/L HCl (roztwór podstawowy). Z roztworu pobrać 2,0 mL i uzupełnić 0,1 mol/L HCl do 100,0 mL. Wykreślić widmo w zakresie 200–400 nm i wyznaczyć analityczną długość fali.

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Z roztworu podstawowego pobrać odpowiednio:

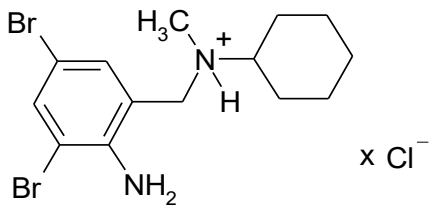
1. 1,0 mL
2. 2,0 mL
3. 3,0 mL
4. 4,0 mL
5. 5,0 mL

Uzupełnić roztwory 0,1 mol/L HCl do 100,0 mL. Dokonać pomiaru absorpcji przy wyznaczonej długości fali. Wykreślić krzywą wzorcową wobec 0,1 mol/L HCl jako odnośnika.

Oznaczenie preparatu o nieznanej zawartości

Odważyć dokładnie ok. 0,1 g substancji badanej i uzupełnić do 100,0 mL 0,1 mol/L HCl. Pobrać z tego roztworu 3,0 mL i uzupełnić do 100,0 mL. Zmierzyć absorbancję i odczytać zawartość z krzywej wzorcowej.

BROMOHEKSYNY CHLOROWODOREK



$C_{14}H_{21}Br_2ClN_2$ m.cz. 412,6

Chlorowodorek N-(2-amino-3,5-dibromobenzylo)-N-metylocykloheksanaminy
Chlorowodorek 2,4-dibromo-[[cykloheksylo-(metylo)-amino]-metylo]anilina

Wykreślenie krzywej wzorcowej

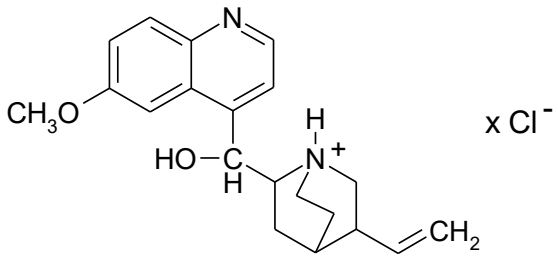
Odważyć dokładnie ok. 0,10 g substancji wzorcowej do kolby miarowej o poj. 100,0 mL i rozpuścić w metanolu (roztwór podstawowy).
Z roztworu podstawowego pobrać odpowiednio:

1. 0,5 mL
2. 1,0 mL
3. 2,0 mL
4. 3,0 mL
5. 5,0 mL

i uzupełnić metanolem do 50,0 mL. Wykreślić krzywą wzorcową przy długości fali 317 nm stosując metanol jako odnośnik.

Oznaczanie preparatu o nieznanej zawartości.
Odważyć dokładnie ok. 0,10 g substancji badanej do kolby miarowej o poj. 100,0 mL i rozpuścić w metanolu. Z roztworu pobrać 3,0 mL i uzupełnić metanolem do 50,0 mL. Zmierzyć absorbancję i odczytać zawartość z krzywej wzorcowej. [8]

CHININY CHLOROWODOREK



$C_{20}H_{25}ClN_2O_2$ m.cz. 360,9

Chlorowodorek (5-etenylo-1-azabicyklo[2.2.2]oktan-2-ylo)-(6-metoksychinolin-4-ylo)-metanolu

Wyznaczenie analitycznej długości fali

Odważyć dokładnie ok. 0,07 g substancji wzorcowej do kolby miarowej o poj. 100,0 mL i rozpuścić w 0,1 mol/L HCl (roztwór podstawowy). Pobrać 4,0 mL tego roztworu i dopełnić do 100,0 ml 0,1 mol/L roztworem HCl. Wyznaczyć analityczną długość fali w zakresie 200–400 nm.

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Z roztworu podstawowego pobrać odpowiednio:

1. 1,0 mL
2. 2,0 mL
3. 3,0 mL

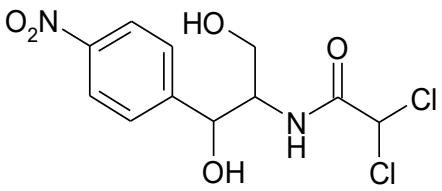
4. 4,0 mL
5. 5,0 mL

i uzupełnić 0,1 mol/L HCl do 100,0 mL. Wykreślić krzywą wzorcową stosując 0,1 mol/L HCl jako odnośnik.

Oznaczenie preparatu o nieznanej zawartości

Odważyć dokładnie ok. 0,07 g substancji badanej i uzupełnić do 100,0 mL 0,1 mol/L HCl. Pobrać z tego roztworu 2,0 mL i uzupełnić 0,1 mol/L HCl do 100,0 mL. Zmierzyć absorbancję i odczytać zawartość z krzywej wzorcowej.

CHLORAMFENIKOL



$C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ m.cz. 323,1

2,2-Dichloro-N-[1,3-dihydroksy-1-(4-nitrofenylo)-propan-2-ylo]-acetamid

Wyznaczenie analitycznej długości fali

Odważyć dokładnie ok. 0,05 g substancji wzorcowej do kolby miarowej poj. 100,0 mL i rozpuścić w 0,1 mol/L HCl (roztwór podstawowy). Pobrać 2,0 mL tego roztworu i dopełnić 0,1 mol/L HCl do 100,0 mL. Tak przygotowany roztwór posłuży do wykreślenia widma i odczytania analitycznej długości fali, przy której prowadzone będzie dalsze oznaczenie.

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Z roztworu podstawowego pobrać odpowiednio:

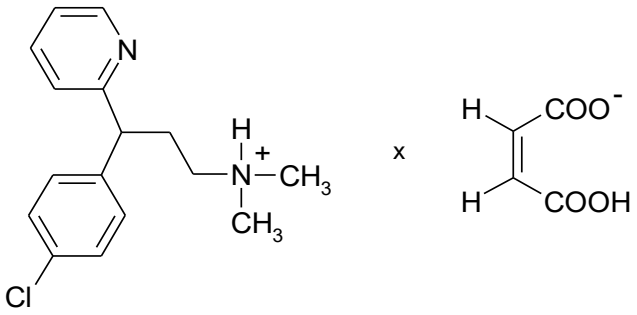
1. 1,0 mL
2. 2,0 mL
3. 3,0 mL
4. 4,0 mL
5. 5,0 mL

i uzupełnić 0,1 mol/L HCl do 100,0 mL. Wykreślić krzywą wzorcową stosując 0,1 mol/L HCl jako odnośnik.

Oznaczenie preparatu o nieznanej zawartości

Odważyć dokładnie ok. 0,05 g substancji badanej i uzupełnić do 100,0 mL 0,1 mol/L HCl. Pobrać z tego roztworu 3,0 mL i uzupełnić do 100,0 mL. Zmierzyć absorbancję i odczytać zawartość z krzywej wzorcowej.

CHLORFENAMINY MALEINIAN



$C_{20}H_{23}ClN_2O_4$ m.cz. 390,9

Wodoromaleinian 3-(4-chlorofenylo)-N,N-dimetylo-3-(pirydyn-2-ylo)-propan-1-aminy

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Odważyć dokładnie ok. 0,05 g substancji wzorcowej do kolby miarowej poj. 100,0 mL i rozpuścić w 0,1 mol/L HCl. Pobrać 10,0 mL roztworu do kolby miarowej poj. 100,0 mL i uzupełnić 0,1 mol/L HCl.

Z roztworu podstawowego pobrać odpowiednio:

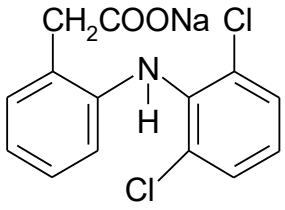
1. 0,2 mL
2. 1,0 mL
3. 2,0 mL
4. 4,0 mL
5. 8,0 mL

i uzupełnić 0,1 mol/L HCl do 10,0 mL. Dokonać pomiaru absorbancji przy 264 nm stosując jako odnośnik 0,1 mol/L HCl. Wykreślić krzywą wzorcową.

Oznaczanie preparatu o nieznanej zawartości

Odważyć dokładnie ok. 0,05 g substancji badanej do kolby miarowej poj. 100,0 mL i rozpuścić w 0,1 mol/L HCl. Pobrać 10,0 mL roztworu do kolby miarowej poj. 100,0 mL i uzupełnić 0,1 mol/L HCl. Z roztworu pobrać 4,0 mL i uzupełnić do 10,0 mL 0,1 mol/L HCl. Zmierzyć absorbancję i odczytać stężenie z krzywej wzorcowej. [10]

DIKLOFENAK SODU



$C_{14}H_{10}Cl_2NO_2Na$ m.cz. 318,13

2-[2-(2,6-Dichlorofenylo)-amino]fenylooctan sodu

Wykreślenie krzywej wzorcowej.

Odważyć dokładnie ok. 0,015 g substancji wzorcowej do kolby miarowej poj. 50,0 mL i uzupełnić metanolem do 50,0 mL.
Z roztworu podstawowego pobrać odpowiednio:

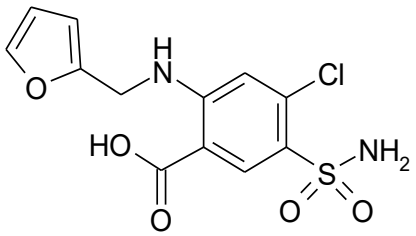
1. 0,5 mL
2. 1,0 mL
3. 1,5 mL
4. 2,0 mL
5. 2,5 mL

i uzupełnić metanolem do 25,0 mL. Zmierzyć absorbancję przy długości fali 282 nm i wykreślić krzywą wzorcową wobec metanolu jako odnośnika.

Oznaczenie preparatu o nieznanej zawartości

Odważyć dokładnie ok. 0,015 g substancji badanej i uzupełnić do 50,0 mL metanolem. Pobrać z tego roztworu 1,5 mL i uzupełnić metanolem do 25,0 mL. Zmierzyć absorbancję i odczytać zawartość z krzywej wzorcowej.

FUROSEMID



$C_{12}H_{11}ClN_2O_5S$ m.cz. 330,7

Kwas 4-chloro-2-(furan-2-ylometyloamino)-5-sulfamoilobenzoesowy

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Odważyć dokładnie ok. 0,050 g substancji wzorcowej do kolby miarowej poj. 100,0 mL i uzupełnić 0,1 mol/L NaOH do 100,0 mL (roztwór podstawowy).
Z roztworu podstawowego pobrać odpowiednio:

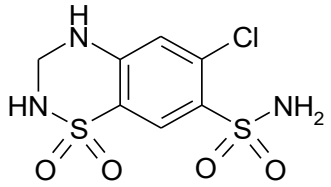
1. 0,2 mL
2. 0,4 mL
3. 0,6 mL
4. 0,8 mL
5. 1,0 mL

i uzupełnić 0,1 mol/L NaOH do 25,0 mL. Zmierzyć absorbancję przy długości fali 271 nm i wykreślić krzywą wzorcową wobec 0,1 mol/L NaOH jako odnośnika.

Oznaczenie preparatu o nieznanej zawartości

Odważyć dokładnie ok. 0,05 g substancji badanej i uzupełnić do 100,0 mL 0,1 mol/L NaOH. Pobrać z tego roztworu 0,7 mL i uzupełnić do 25,0 mL 0,1 mol/L NaOH. Zmierzyć absorbancję i odczytać zawartość z krzywej wzorcowej [11].

HYDROCHLOROTIAZYD



$C_7H_8ClN_3O_4S_2$ m.cz. 297,7

6-Chloro-1,1-diokso-3,4-dihydro-2*H*-1,2,4-benzotiadiazyno-7-sulfonamid

Wykreślenie krzywej wzorcowej.

Odważyć dokładnie ok. 0,050 g substancji wzorcowej do kolby miarowej poj. 50,0 mL i uzupełnić 0,1 mol/L NaOH do 50,0 mL.
Z roztworu podstawowego pobrać odpowiednio:

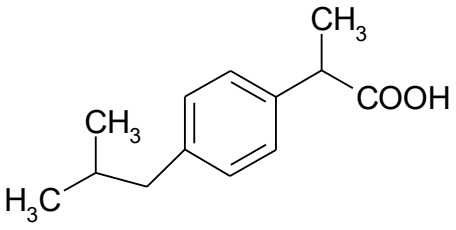
1. 1,0 mL
2. 2,0 mL
3. 3,0 mL
4. 4,0 mL
5. 5,0 mL

i uzupełnić 0,1 mol/L NaOH do 50,0 mL. Zmierzyć absorbancję przy długości fali 323 nm i wykreślić krzywą wzorcową wobec 0,1 mol/L NaOH jako odnośnika.

Oznaczenie preparatu o nieznanej zawartości

Odważyć dokładnie ok. 0,05 g substancji badanej i uzupełnić do 50,0 mL 0,1 mol/L NaOH. Pobrać z tego roztworu 3,0 mL i uzupełnić 0,1 mol/L NaOH do 50,0 mL. Zmierzyć absorbancję przy 323 nm i odczytać zawartość z krzywej wzorcowej [12].

IBUPROFEN



$C_{13}H_{18}O_2$ m.cz. 206,28

Kwas 2-(4-izobutylofenylo)propionowy

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Odważyć dokładnie ok. 0,050 g substancji wzorcowej do kolby miarowej poj. 50,0 mL i uzupełnić roztworem NaOH (4 g/L).
Z roztworu podstawowego pobrać odpowiednio:

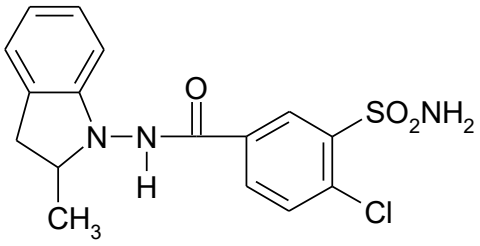
1. 2,0 mL
2. 4,0 mL
3. 6,0 mL
4. 8,0 mL
5. 10,0 mL

i uzupełnić roztworem NaOH (4 g/L) do 25,0 mL. Zmierzyć absorbancję przy długości fali 264 nm i wykreślić krzywą wzorcową wobec roztworu NaOH (4 g/L) jako odnośnika.

Oznaczenie preparatu o nieznanej zawartości

Odważyć dokładnie ok. 0,05 g substancji badanej i uzupełnić do 50,0 mL roztworem NaOH (4 g/L). Pobrać z tego roztworu 5,0 mL i uzupełnić do 25,0 mL takim samym roztworem. Zmierzyć absorbancję przy 264 nm i odczytać zawartość z krzywej wzorcowej.

INDAPAMID



$C_{16}H_{16}ClN_3O_3S$ m.cz. 365.8

4-Chloro-N-(2-metylo-2,3-dihydroindol-1-ilo)-3-sulfamoilobenzamid

Wyznaczenie analitycznej długości fali

Odważyć dokładnie ok. 0,05 g substancji wzorcowej do kolby miarowej poj. 50,0 mL i rozpuścić w metanolu (roztwór podstawowy). Pobrać 1,0 mL tego roztworu i dopełnić do 50,0 mL metanol. Tak przygotowany roztwór posłuży do wykreślenia widma i odczytania analitycznej długości fali, przy której prowadzone będzie dalsze oznaczenie.

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Z roztworu podstawowego pobrać odpowiednio:

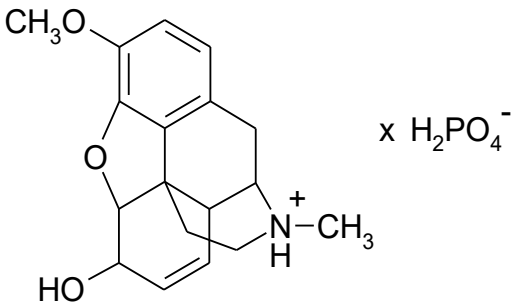
1. 0,025 mL
2. 0,050 mL
3. 0,10 mL
4. 0,20 mL
5. 0,80 mL

i uzupełnić metanolem do 50,0 mL. Zmierzyć absorbancję i wykreślić krzywą wzorcową wobec metanolu jako odnośnika.

Oznaczenie preparatu o nieznanej zawartości

Odważyć dokładnie ok. 0,05 g substancji badanej i uzupełnić do 50,0 mL metanolem. Pobrać z tego roztworu 0,4 mL i uzupełnić do 50,0 mL metanolem. Zmierzyć absorbancję i odczytać zawartość z krzywej wzorcowej [12].

KODEINY FOSFORAN



$C_{18}H_{24}NO_7P$ m.cz. 397,4

Diwodorofosforan 4,5-epoksy-3-metoksy-17-metylomorfin-7-en-6-olu

Wyznaczenie analitycznej długości fali

Odważyć dokładnie ok. 0,1 g substancji wzorcowej do kolby miarowej poj. 100,0 mL i rozpuścić w 0,1 mol/L HCl (roztwór podstawowy). Pobrać 10,0 mL tego roztworu i uzupełnić w kolbie miarowej poj. 100,0 mL 0,1 mol/L HCl. Wykreślić widmo w zakresie 200–400 nm

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Z roztworu podstawowego pobrać odpowiednio:

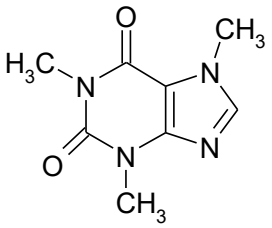
1. 2,0 mL
2. 4,0 mL
3. 6,0 mL
4. 8,0 mL
5. 10,0 mL

i uzupełnić 0,1 mol/L HCl do 100,0 mL. Zmierzyć absorbancję i wykreślić krzywą wzorcową wobec 0,1 mol/L HCl jako odnośnika.

Oznaczenie preparatu o nieznanej zawartości

Odważyć dokładnie ok. 0,1 g substancji badanej i uzupełnić do 100,0 mL 0,1 mol/L HCl. Pobrać z tego roztworu 5,0 mL i uzupełnić do 100,0 mL takim samym roztworem. Zmierzyć absorbancję i odczytać zawartość z krzywej wzorcowej.

KOFEINA



$C_8H_{10}N_4O_2$ m.cz. 194,2

1,3,7-Trimetylopuryno-2,6-dion

Wyznaczenie analitycznej długości fali

Odważyć dokładnie ok. 0,01 g substancji wzorcowej do kolby miarowej poj. 100,0 mL i rozpuścić w 0,1 mol/L HCl (roztwór podstawowy). Z roztworu pobrać 5,0 mL i uzupełnić do 50,0 mL 0,1 mol/L HCl. Wyznaczyć analityczną długość fali w zakresie 200–400 nm.

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Z roztworu podstawowego pobrać odpowiednio:

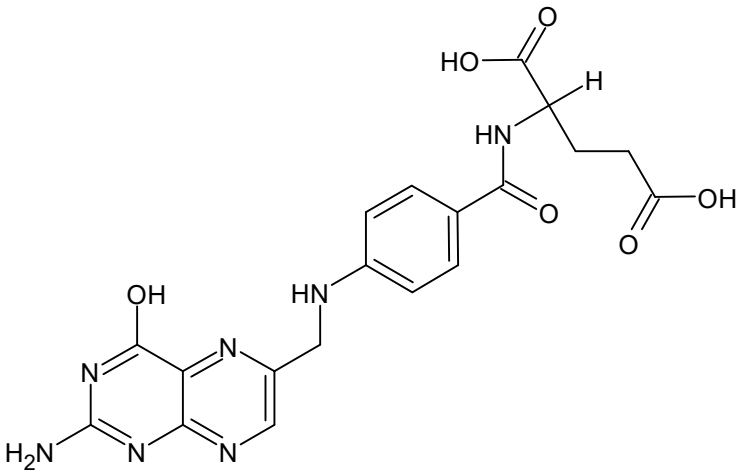
1. 0,5 mL
2. 1,0 mL
3. 1,5 mL
4. 2,0 mL
5. 2,5 mL

i uzupełnić 0,1 mol/L HCl do 50,0 mL. Wykreślić krzywą wzorcową stosując 0,1 mol/L HCl jako odnośnik.

Oznaczenie preparatu o nieznanej zawartości

Odważyć dokładnie ok. 0,01 g substancji badanej i uzupełnić do 100,0 mL 0,1 mol/L HCl. Pobrać z tego roztworu 2,0 mL i uzupełnić do 50,0 mL 0,1 mol/L HCl. Zmierzyć absorbancję i odczytać zawartość z krzywej wzorcowej.

KWAS FOLIOWY



$C_{19}H_{19}N_7O_6$ m.cz. 441,4

Kwas 2-[[4-[(2-amino-4-hydroksy-3H-pterydyn-6-ylo)metyloamino]benzoilo]amino]-pentanodiowy

Wyznaczenie analitycznej długości fali

Odważyć dokładnie ok. 0,10 g substancji wzorcowej do kolby miarowej o poj. 100,0 mL i rozpuścić w 0,1 mol/L roztworze NaOH (roztwór podstawowy). Wyznaczyć analityczną długość fali w zakresie 200–400 nm wobec 0,1 mol/L NaOH jako odnośnika.

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Z roztworu podstawowego pobrać odpowiednio:

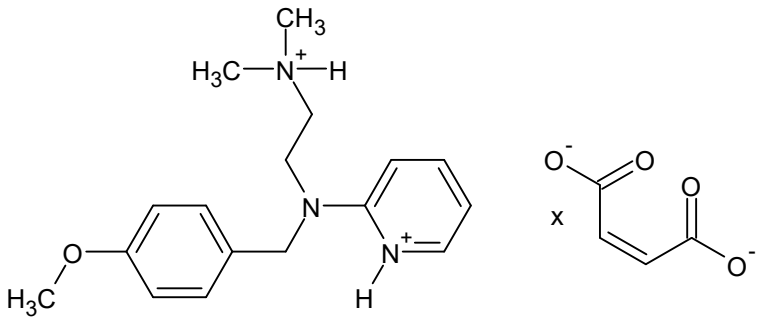
1. 0,05 mL
2. 0,10 mL
3. 0,20 mL
4. 0,40 mL
5. 0,80 mL

i uzupełnić 0,1 mol/L roztworem NaOH do 50,0 mL. Wykreślić krzywą wzorcową stosując 0,1 mol/L roztwór NaOH jako odnośnik.

Oznaczenie preparatu o nieznanej zawartości

Odważyć dokładnie ok. 0,10 g substancji badanej i uzupełnić do 100,0 mL 0,1 mol/L roztworem NaOH. Pobrać z tego roztworu 0,5 mL i uzupełnić do 50,0 mL 0,1 mol/L roztworem NaOH. Zmierzyć absorbancję i odczytać zawartość z krzywej wzorcowej [13].

MEPIRAMINY MALEINIAN



$C_{21}H_{27}N_3O_5$ m.cz. 401.5

But-2-enodionian N'-[(4-metoksyfenylo)metylo]-N,N-dimetylo-N'-pirydyn-2-yloetano-1,2-diaminy

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Odważyć dokładnie ok. 0,050 g substancji wzorcowej do kolby miarowej poj. 100,0 mL i rozpuścić w 0,1 mol/L HCl. Pobrać 10,0 mL roztworu do kolby miarowej poj. 100,0 mL i uzupełnić 0,1 mol/L HCl (roztwór podstawowy).
Z roztworu podstawowego pobrać odpowiednio:

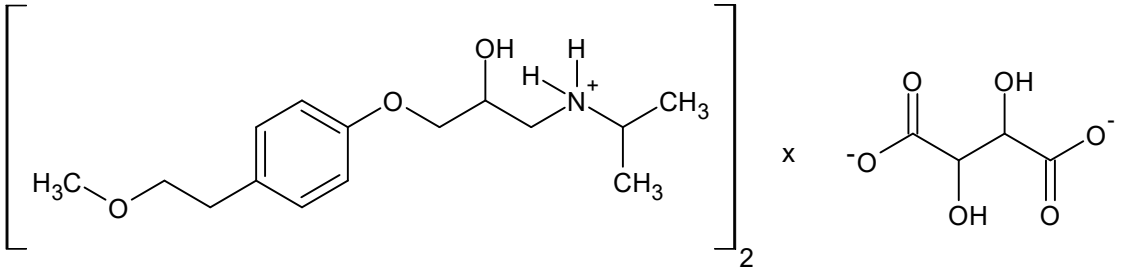
1. 0,2 mL
2. 0,5 mL
3. 1,0 mL
4. 2,0 mL
5. 4,0 mL

i uzupełnić roztwory do 10,0 mL 0,1 mol/L HCl. Wykreślić krzywą wzorcową przy długości fali 238 nm stosując 0,1 mol/L HCl jako odnośnik.

Oznaczanie preparatu o nieznanej zawartości substancji.

Odważyć dokładnie ok. 0,050 g substancji badanej do kolby miarowej poj. 100,0 mL i rozpuścić w 0,1 mol/L HCl. Pobrać 10,0 mL roztworu do kolby miarowej poj. 100,0 mL i uzupełnić 0,1 mol/L HCl. Z otrzymanego roztworu pobrać 1,5 mL i uzupełnić do 10,0 mL 0,1 mol/L HCl. Zmierzyć absorbancję przy 238 nm i odczytać stężenie z krzywej wzorcowej [10].

METOPROLOLU WINIAN



$C_{34}H_{56}N_2O_{12}$ m.cz. 684,8

2,3-Dihydroksybutanodionian 1-[4-(2-Metoksyetylo)fenoksy]-3-(propan-2-yloamino)propan-2-olu

Wyznaczenie analitycznej długości fali

Odważyć dokładnie ok. 0,1 g substancji wzorcowej do kolby miarowej poj. 100,0 mL i rozpuścić w 0,1 mol/L HCl (roztwór podstawowy). Z roztworu pobrać 2,0 mL i uzupełnić do 100,0 mL 0,1 mol/L HCl. Wyznaczyć analityczną długość fali w zakresie 200–400 nm.

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Z roztworu podstawowego pobrać odpowiednio:

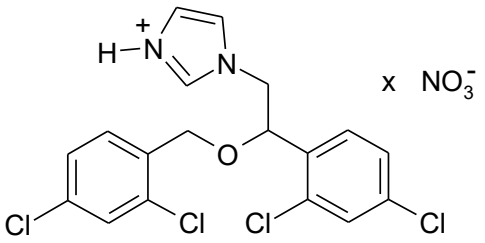
1. 1,0 mL
2. 2,0 mL
3. 3,0 mL
4. 4,0 mL
5. 5,0 mL

I uzupełnić 0,1 mol/L HCl do 100,0 mL. Wykreślić krzywą wzorcową stosując 0,1 mol/L HCl jako odnośnik.

Oznaczenie preparatu o nieznanej zawartości

Odważyć dokładnie ok. 0,1 g substancji badanej i uzupełnić do 100,0 mL 0,1 mol/L HCl. Pobrać z tego roztworu 3,0 mL i uzupełnić do 100,0 mL. Zmierzyć absorbancję i odczytać zawartość z krzywej wzorcowej.

MIKONAZOLU AZOTAN



$C_{18}H_{15}Cl_4N_3O_4$ m.cz. 479,1

Azotan 1-[2-(2,4-dichlorobenzyloksy)-2-(2,4-dichlorofenylo)-etylo]-imidazolu
Azotan 1-[2(-(2,4-dichlorofenylo)-2-[(2,4-dichlorofenylo)-metoksy]-etylo]-imidazolu

Wyznaczenie analitycznej długości fali

Odważyć dokładnie ok. 0,10 g substancji wzorcowej do kolby miarowej poj. 50,0 mL (roztwór podstawowy). Substancję rozpuścić w mieszaninie metanol – 0,1 mol/L HCl (9:1; v/v), ogrzać na łaźni wodnej do rozpuszczenia. Po ochłodzeniu uzupełnić ww. mieszaniną do 50,0 mL. Pobrać 12,0 mL roztworu do kolby miarowej poj. 25,0 mL, uzupełnić mieszaniną metanol – 0,1 mol/L HCl (9:1; v/v). Wykreślić widmo w zakresie 200–400 nm stosując mieszaninę metanol – 0,1 mol/L HCl (9:1; v/v) jako odnośnik. Wybrać analityczną długość fali do dalszych oznaczeń.

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Z roztworu podstawowego pobrać odpowiednio:

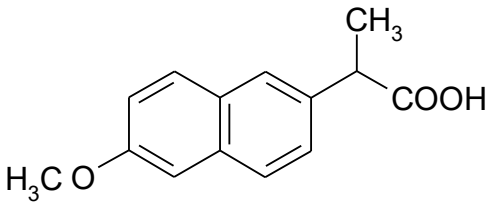
1. 0,5 mL
2. 2,0 mL
3. 4,0 mL
4. 6,0 mL
5. 8,0 mL

i uzupełnić mieszaniną metanol – 0,1 mol/L HCl (9:1; v/v) do 25,0 mL. Wykreślić krzywą wzorcową stosując mieszaninę metanol – 0,1 mol/L HCl (9:1; v/v) jako odnośnika.

Oznaczanie preparatu o nieznanej zawartości.

Odważyć dokładnie ok. 0,10 g substancji badanej do kolby miarowej o poj. 50,0 mL, rozpuścić ogrzewając na łaźni wodnej w mieszaninie metanol – 0,1 mol/L HCl (9:1; v/v) i uzupełnić taką samą mieszaniną do 50,0 mL. Z roztworu pobrać 4,0 mL i uzupełnić ww. mieszanina do 25,0 mL. Zmierzyć absorbancję i odczytać zawartość z krzywej wzorcowej [14].

NAPROKSEN



$C_{14}H_{14}O_3$ m.cz. 230,26

Kwas 2-(6-metoksynaft-2-ylo)propionowy

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Odważyć dokładnie ok. 0,1 g substancji wzorcowej do kolby miarowej poj. 100,0 mL i uzupełnić metanolem do 100,0 mL (roztwór podstawowy).
Z roztworu podstawowego pobrać odpowiednio:

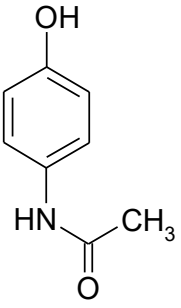
1. 0,2 mL
2. 0,4 mL
3. 0,6 mL
4. 0,8 mL
5. 1,0 mL

i uzupełnić metanolem do 25,0 mL. Zmierzyć absorbancję przy długości fali 262 nm i wykreślić krzywą wzorcową wobec metanolu jako odnośnika.

Oznaczenie preparatu o nieznanej zawartości

Odważyć dokładnie ok. 0,1 g substancji badanej i uzupełnić do 100,0 mL metanolem. Pobrać z tego roztworu 0,50 mL roztworu i uzupełnić metanolem do 25,0 mL. Zmierzyć absorbancję i odczytać zawartość z krzywej wzorcowej.

PARACETAMOL



$C_8H_9NO_2$ m.cz. 151,2

N-(4-hydroksyfenylo)-acetamid

Wyznaczenie analitycznej długości fali

Odważyć dokładnie ok. 0,01 g substancji wzorcowej do kolby miarowej poj. 100,0 mL i rozpuścić w 0,1 mol/L HCl (roztwór podstawowy). Pobrać 1,5 mL tego roztworu i uzupełnić do 100,0 mL 0,1 mol/L HCl.
Wyznaczyć analityczną długość fali w zakresie 200–400 nm.

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Z roztworu podstawowego pobrać odpowiednio:

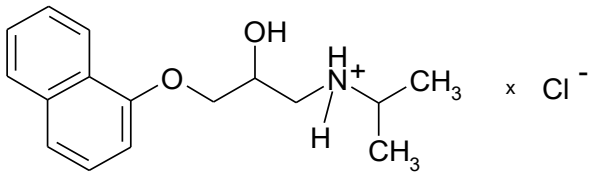
1. 1,0 mL
2. 1,5 mL
3. 2,0 mL
4. 2,5 mL
5. 3,0 mL

i uzupełnić 0,1 mol/L HCl do 100,0 mL. Wykreślić krzywą wzorcową stosując 0,1 mol/L HCl jako odnośnik.

Oznaczenie preparatu o nieznanej zawartości

Odważyć dokładnie ok. 0,01 g substancji badanej i uzupełnić do 100,0 mL 0,1 mol/L HCl. Pobrać z tego roztworu 2,0 mL i uzupełnić do 100,0 mL takim samym roztworem. Zmierzyć absorbancję i odczytać zawartość z krzywej wzorcowej.

PROPRANOLOLU CHLOROWODOREK



$C_{16}H_{22}ClNO_2$ m.cz. 295,8

Chlorowodorek 1-(naftalen-1-yloksy)-3-(propan-2-yloamino)-propan-2-olu

Wyznaczenie analitycznej długości fali

Odważyć dokładnie ok. 0,15 g substancji wzorcowej do kolby miarowej o poj. 100,0 mL i rozpuścić w 0,1 mol/L HCl (roztwór podstawowy). Z roztworu pobrać 2,0 mL i uzupełnić do 100,0 mL 0,1 mol/L HCl. Wyznaczyć analityczną długość fali w zakresie 200–400 nm.

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Z roztworu podstawowego pobrać odpowiednio:

1. 1,5 mL
2. 2,0 mL
3. 2,5 mL

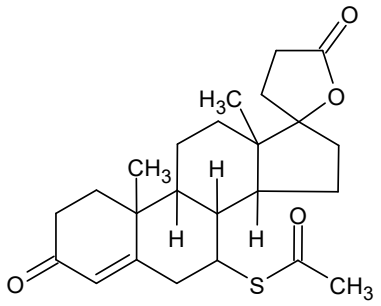
4. 3,0 mL
5. 3,5 mL

i uzupełnić 0,1 mol/L HCl do 100,0 mL. Wykreślić krzywą wzorcową stosując 0,1 mol/L HCl jako odnośnik.

Oznaczenie preparatu o nieznanej zawartości

Odważyć dokładnie ok. 0,15 g substancji badanej i uzupełnić do 100,0 mL 0,1 mol/L HCl. Pobrać z tego roztworu 3,0 mL i uzupełnić do 100,0 mL. Zmierzyć absorbancję i odczytać zawartość z krzywej wzorcowej.

SPIRONOLAKTON



$C_{24}H_{32}O_4S$ M.cz. 416,6

Kwas 7-(acetylotio)-17-hydroksy-3-okso-pregn-4-ene-21-karboksylowy

S-[(7R,8R,9S,10R,13S,14S,17R)-10,13-dimetylo-3,5'-dioksospiro-[2,6,7,8,9,11,12,14,15,16-dekahydro-1H-cyklopentan[a]fenantreno-17,2'-oksolan]-7-ylo] etanotionian

Wyznaczenie analitycznej długości fali

Odważyć dokładnie ok. 0,10 g substancji wzorcowej do kolby miarowej o poj. 100,0 mL i rozpuścić w metanolu (roztwór podstawowy). Z roztworu pobrać 1,0 mL i uzupełnić do 50,0 metanolem. Wyznaczyć analityczną długość fali w zakresie 200–400 nm.

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Z roztworu podstawowego pobrać odpowiednio:

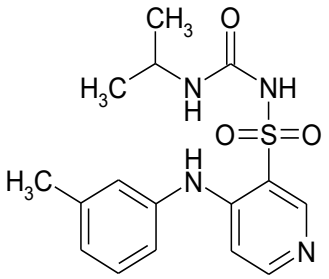
1. 0,05 mL
2. 0,10 mL
3. 0,20 mL
4. 0,40 mL
5. 0,80 mL

i uzupełnić metanolem do 50,0 mL. Wykreślić krzywą wzorcową stosując metanol jako odnośnik.

Oznaczenie preparatu o nieznanej zawartości

Odważyć dokładnie ok. 0,10 g substancji badanej i uzupełnić do 100,0 mL metanolem. Pobrać z tego roztworu 0,50 mL i uzupełnić metanolem do 50,0 mL. Zmierzyć absorbancję i odczytać zawartość z krzywej wzorcowej [12].

TORASEMID



$C_{16}H_{20}N_4O_3S$ m.cz. 348,4

1-Izopropylo-3-[[4-[(3-metylofenylo)-amino]-pirydyn-3-ylo]-sulfonylo]-mocznik;
1-[4-(3-Metyloanilino)-pirydyn-3-ylo]-sulfonylo-3-propan-2-ylo-mocznik

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Odważyć dokładnie ok. 0,050 g substancji wzorcowej do kolby miarowej poj. 100,0 mL i rozpuścić w 0,1 mol/L NaOH (roztwór podstawowy).
Z roztworu podstawowego pobrać odpowiednio:

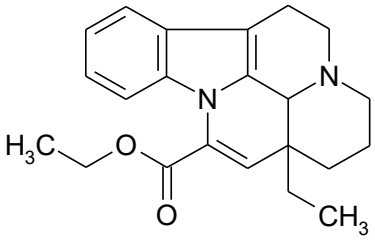
1. 0,2 mL
2. 0,4 mL
3. 0,6 mL
4. 0,8 mL
5. 1,0 mL

i uzupełnić 0,1 mol/L NaOH do 25,0 mL. Zmierzyć absorbancję przy długości fali 284 nm i wykreślić krzywą wzorcową wobec 0,1 mol/L NaOH jako odnośnika.

Oznaczenie preparatu o nieznanej zawartości

Odważyć dokładnie ok. 0,05 g substancji badanej i uzupełnić do 100,0 mL 0,1 mol/L NaOH. Pobrać z tego roztworu 0,7 mL i uzupełnić do 25,0 mL 0,1 mol/L NaOH. Zmierzyć absorbancję przy 284 nm i odczytać zawartość z krzywej wzorcowej [11].

VINPOCETYNA



$C_{22}H_{26}N_2O_2$ m.cz. 350,3

15-etylo-1,11-diazapentacyklo[9.6.$0^{2,7}$.$0^{8,18}$.$0^{15,19}$]nonadeka-2,4,6,8(18),16-pentaeno-17-karboksylan etylu.

Wyznaczenie analitycznej długości fali

Odważyć dokładnie ok. 0,10 g substancji wzorcowej do kolby miarowej poj. 100,0 mL i rozpuścić w 0,1 mol/L HCl (roztwór podstawowy). Z roztworu pobrać 1,0 mL i uzupełnić do 100,0 mL 0,1 mol/L HCl. Wyznaczyć analityczną długość fali w zakresie 200-400 nm.

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Z roztworu podstawowego pobrać odpowiednio:

1. 0,25 mL
2. 0,50 mL
3. 1,00 mL
4. 3,00 mL
5. 4,00 mL

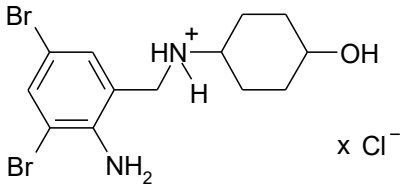
i uzupełnić 0,1 mol/L HCl do 100,0 mL. Wykreślić krzywą wzorcową stosując 0,1 mol/L HCl jako odnośnik.

Oznaczenie preparatu o nieznanej zawartości

Odważyć dokładnie ok. 0,10 g substancji badanej i uzupełnić do 100,0 mL 0,1 mol/L HCl. Pobrać z tego roztworu 2,0 mL i uzupełnić do 100,0 mL 0,1 mol/L HCl. Zmierzyć absorbancję i odczytać zawartość z krzywej wzorcowej [15].

1.3. Spektrofotometria w świetle Vis – monografie szczegółowe

AMBROKSOLU CHLOROWODOREK



$C_{13}H_{19}Br_2ClN_2O$ m.cz. 414,6

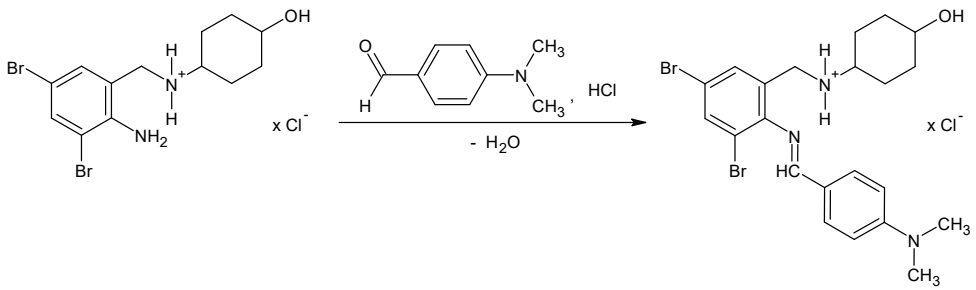
Chlorowodorek 4-(2-amino-3,5-dibromobenzyloamino)cykloheksanolu

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Odważyć dokładnie ok. 0,10 g substancji wzorcowej do kolby miarowej poj. 100,0 mL i rozpuścić ogrzewając na łaźni wodnej w 0,1 mol/L HCl (roztwór podstawowy)
Z roztworu podstawowego przygotować następujące rozcieńczenia:

1. 1,0 mL roztworu podstawowego + 9,0 mL 0,1 mol/L HCl
2. 2,0 mL roztworu podstawowego + 8,0 mL 0,1 mol/L HCl
3. 3,0 mL roztworu podstawowego + 7,0 mL 0,1 mol/L HCl
4. 4,0 mL roztworu podstawowego + 6,0 mL 0,1 mol/L HCl
5. 5,5 mL roztworu podstawowego + 4,5 mL 0,1 mol/L HCl

Do każdego z tak przygotowanych roztworów dodać 10,0 mL 1% roztworu DMABA w 10% HCl. Dokonać pomiaru absorbancji przy 420 nm stosując jako odnośnik mieszaninę 10,0 mL 0,1 mol/L HCl i 10,0 mL 1% roztworu DMABA w 10% HCl. Wykreślić krzywą wzorcową.

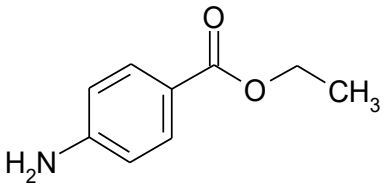


Oznaczanie preparatu o nieznanej zawartości.

Odważyć dokładnie ok. 0,10 g substancji badanej do kolby miarowej poj. 100,0 mL i rozpuścić w 0,1 mol/L HCl, ogrzewając na łaźni wodnej. Z roztworu pobrać 4,0 mL i dopełnić 0,1 mol/L HCl do 10,0 mL. Do roztworu dodać 10,0 mL 1% roztworu DMABA

w 10% HCl. Zmierzyć absorbancję i odczytać zawartość z krzywej wzorcowej, stosując mieszaninę 10,0 mL 0,1 mol/L HCl i 10,0 mL roztworu DMABA jako odnośnik. [8]

BENZOKAINA



$C_9H_{11}NO_2$ m.cz. 165,2

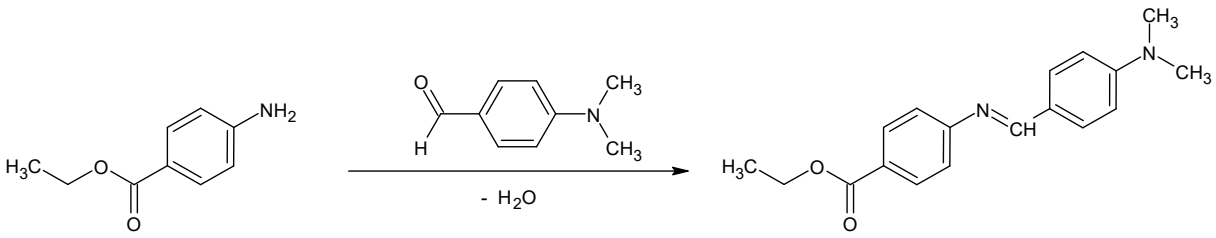
4-Aminobenzoesan etylu

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Odważyć dokładnie ok. 0,10 g substancji wzorcowej do kolby miarowej poj. 100,0 mL i rozpuścić w metanolu (roztwór podstawowy). Pobrać z tego roztworu 10,0 mL do kolby miarowej poj. 100,0 mL i uzupełnić metanolem.
Z tego roztworu przygotować następujące rozcieńczenia:

1. 0,5 mL + 9,5 mL metanolu
2. 1,0 mL + 9,0 mL metanolu
3. 2,0 mL + 8,0 mL metanolu
4. 3,0 mL + 7,0 mL metanolu
5. 4,0 mL + 6,0 mL metanolu

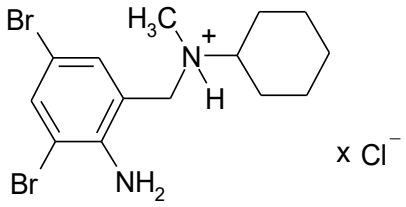
Do każdego z tak przygotowanych roztworów dodać 10,0 mL 1% roztworu DMABA w 10% HCl. Dokonać pomiaru absorbancji przy 456 nm stosując jako odnośnik mieszaninę 10,0 mL metanolu i 10,0 mL 1% roztworu DMABA w 10% HCl. Wykreślić krzywą wzorcową.



Oznaczanie preparatu o nieznanej zawartości.

Odważyć dokładnie ok. 0,10 g substancji badanej do kolby miarowej poj. 100,0 mL i rozpuścić w metanolu. Z roztworu pobrać 10,0 mL i dopełnić metanolem do 100,0 mL. Pobrać 3,0 mL tego roztworu i uzupełnić metanolem do 10,0 mL. Do roztworu dodać 10,0 mL 1% roztworu DMABA w 10% HCl. Zmierzyć absorbancję i odczytać zawartość z krzywej wzorcowej, stosując mieszaninę 10,0 mL metanolu i 10,0 mL roztworu DMABA jako odnośnik.

BROMOHEKSYNY CHLOROWODOREK



$C_{14}H_{21}Br_2ClN_2$ m.cz. 412,6

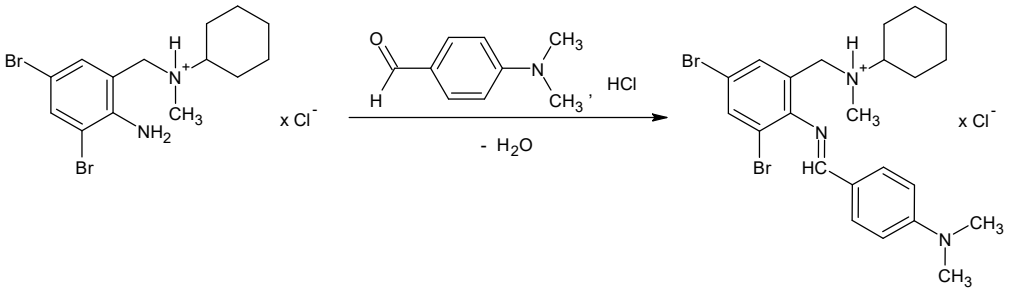
Chlorowodorek N-(2-amino-3,5-dibromobenzylo)-N-metylocykloheksanaminy
Chlorowodorek 2,4-dibromo-[[cykloheksylo-(metylo)amino]metylo]-anilina

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Odważyć dokładnie ok. 0,10 g substancji wzorcowej do kolby miarowej poj. 100,0 mL i rozpuścić w metanolu (roztwór podstawowy).
Z roztworu podstawowego przygotować następujące rozcieńczenia:

1. 0,5 mL roztworu podstawowego + 9,5 mL metanolu
2. 1,0 mL roztworu podstawowego + 9,0 mL metanolu
3. 2,0 mL roztworu podstawowego + 8,0 mL metanolu
4. 3,0 mL roztworu podstawowego + 7,0 mL metanolu
5. 4,0 mL roztworu podstawowego + 6,0 mL metanolu

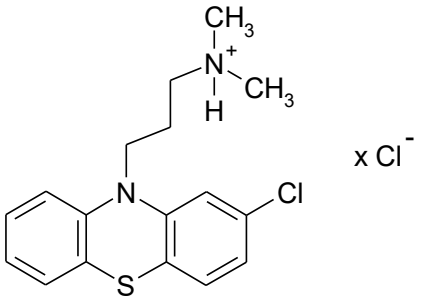
Do każdego z tak przygotowanych roztworów dodać 10,0 mL 1% roztworu DMABA w 10% HCl. Dokonać pomiaru absorbancji przy 422 nm stosując jako odnośnik mieszaninę 10,0 mL metanolu i 10,0 mL 1% roztworu DMABA w 10% HCl. Wykreślić krzywą wzorcową.



Oznaczanie preparatu o nieznanej zawartości.

Odważyć dokładnie ok. 0,10 g substancji badanej do kolby miarowej o poj. 100,0 mL i rozpuścić w metanolu. Z roztworu pobrać 2,0 mL i dopełnić metanolem do 10,0 mL. Do roztworu dodać 10,0 mL 1% roztworu DMABA w 10% HCl. Zmierzyć absorbancję i odczytać zawartość z krzywej wzorcowej, stosując mieszaninę 10,0 mL metanolu i 10,0 mL 1% roztworu DMABA w 10% HCl jako odnośnik. Zmierzyć absorbancję i odczytać zawartość z krzywej wzorcowej. [8]

CHLORPROMAZYNY CHLOROWODOREK



$C_{17}H_{20}Cl_2N_2S$ m.cz. 355,3

Chlorowodorek 3-(2-chlorofenotiazyn-10-ylo)-N,N-dimetylopropan-1-aminy

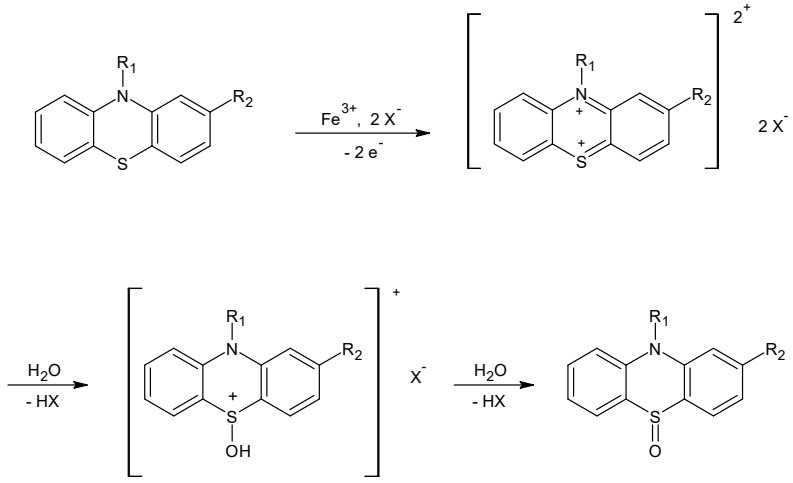
Wykreślenie krzywej wzorcowej

Odważyć dokładnie ok. 0,10 g substancji wzorcowej do kolby miarowej o poj. 100,0 mL, rozpuścić i dopełnić 0,1 mol/L HCl (roztwór podstawowy).

Z tego roztworu przygotować następujące rozcieńczenia:

1. 2,0 mL roztworu podstawowego + 8,0 mL wody
2. 4,0 mL roztworu podstawowego + 6,0 mL wody
3. 6,0 mL roztworu podstawowego + 4,0 mL wody
4. 8,0 mL roztworu podstawowego + 2,0 mL wody
5. 10,0 mL roztworu podstawowego + 0,0 mL wody

Do każdego z otrzymanych roztworów dodać 1,0 mL 5% (50 g/L) roztworu $FeCl_3$. Ograniczyć dostęp światła i po około 5 minutach dokonać pomiaru kolorymetrycznego przy długości fali 530 nm wobec roztworu 10,0 mL wody z dodatkiem 1,0 mL 5% (50 g/L) roztworu $FeCl_3$ jako odnośnika. Wykreślić krzywą wzorcową.

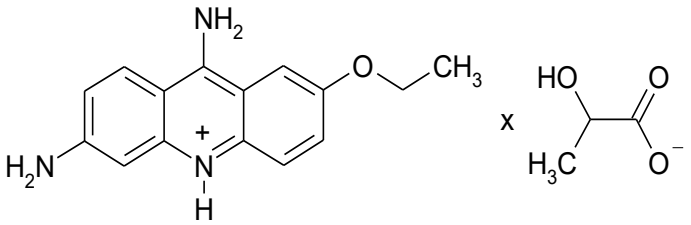


Oznaczanie preparatu o nieznanej zawartości

Odważyć dokładnie około 0,10 g substancji badanej do kolby miarowej poj. 100,0 mL, rozpuścić i uzupełnić 0,1 mol/L HCl.

Pobrać 5 mL tego roztworu, dodać 5,0 mL wody i dodać 1,0 mL 5% roztworu $FeCl_3$. Ograniczyć dostęp światła i po około 5 minutach dokonać pomiaru przy długości fali 530 nm wobec roztworu 10,0 mL wody z dodatkiem 1,0 mL 5% (50 g/L) roztworu $FeCl_3$ jako odnośnika. Odczytać stężenie z krzywej kalibracji.

ETAKRYDYNY MLECZAN



$C_{18}H_{21}N_3O_4$ m.cz. 343,4

2-Hydroksypropionian 7-etoksyakrydyno-3,9-diaminy

METODA I

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Odważyć dokładnie ok. 0,10 g substancji wzorcowej, rozpuścić w kolbie miarowej poj. 100,0 mL i uzupełnić wodą destylowaną (jeśli to konieczne użyć łaźni ultradźwiękowej do rozpuszczenia substancji) – roztwór podstawowy.
Przygotować następujące rozcieńczenia:

1. 0,2 mL roztworu + 9,8 mL wody
2. 0,4 mL roztworu + 9,6 mL wody
3. 0,6 mL roztworu + 9,4 mL wody
4. 0,8 mL roztworu + 9,2 mL wody
5. 1,0 mL roztworu + 9,0 mL wody

Dokonać pomiaru absorbancji przy 435 nm stosując wodę jako odnośnik. Wykreślić krzywą wzorcową.

Oznaczanie preparatu o nieznanej zawartości

Odważyć dokładnie ok. 0,10 g preparatu badanego, rozpuścić w wodzie w kolbie miarowej poj. 100,0 mL. Pobrać 0,6 mL roztworu i uzupełnić wodą do 10,0 mL. Zmierzyć absorbancję i odczytać stężenie z krzywej wzorcowej.

METAODA II

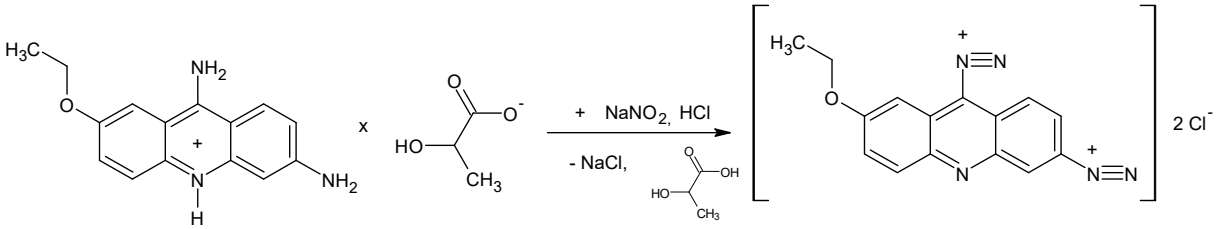
Wykreślenie krzywej wzorcowej

Odważyć dokładnie ok. 0,025 g substancji wzorcowej i uzupełnić metanolem w kolbie miarowej poj. 50,0 mL. Pobrać 12,5 mL tego roztworu przenieść do kolby miarowej poj. 50,0 ml i uzupełnić metanolem.

Przygotować następujące rozcieńczenia:

1. 4,0 mL roztworu + 6,0 mL wody
2. 5,0 mL roztworu + 5,0 mL wody
3. 6,0 mL roztworu + 4,0 mL wody
4. 7,0 mL roztworu + 3,0 mL wody
5. 8,0 mL roztworu + 2,0 mL wody

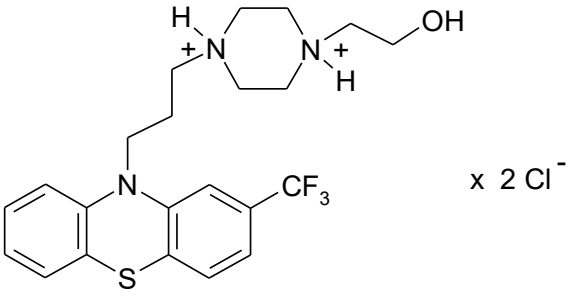
Do każdego z otrzymanych roztworów dodać 1,0 mL 0,1 mol/L roztworu $NaNO_2$ i 1,0 mL 10% H_2SO_4 w metanolu. Po około 30 minutach dokonać pomiaru absorbancji przy 426 nm wobec odnośnika, który stanowi mieszanina 1,0 mL 0,1 mol/L roztworu $NaNO_2$ i 1,0 mL 10% H_2SO_4 w metanolu. Wykreślić krzywą wzorcową.



<u>Oznaczanie preparatu o nieznanej zawartości.</u>

Odważyć dokładnie ok. 0,02 g substancji badanej, rozpuścić w metanolu w kolbie miarowej poj. 50,0 mL. Pobrać 12,5 mL tego roztworu i uzupełnić w kolbie miarowej poj. 50,0 mL. Pobrać 5,0 mL tego roztworu, dodać 1,0 mL 0,1 mol/L roztworu $NaNO_2$ i 1,0 mL 10% H_2SO_4 w metanolu. Po ok. 30 minutach dokonać pomiaru absorbancji. Odczytać stężenie z krzywej wzorcowej.

FLUFENAZYNY DICHLOROWODOREK



$C_{22}H_{28}Cl_2F_3N_3OS$ m.cz. 510,4

Dichlorowodorek 2-[4-[3-[2-(trifluorometylo)-fenotiazyn-10-ylo]-propylo]-piperazyn-1-ylo]etanolu

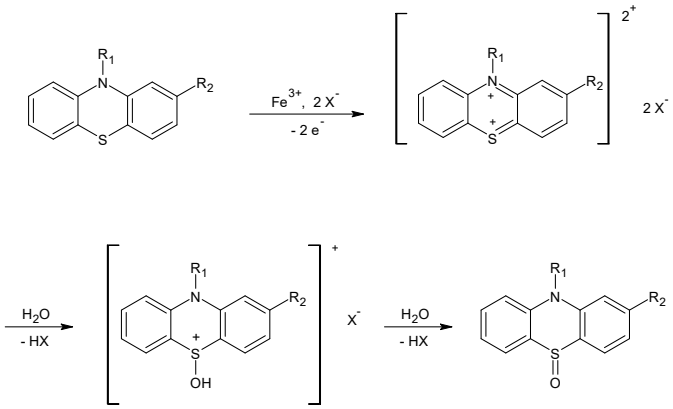
<u>Wykreślenie krzywej wzorcowej</u>

Odważyć dokładnie ok. 0,10 g substancji wzorcowej do kolby miarowej o poj. 100,0 mL, rozpuścić i dopełnić 0,1 mol/L HCl. (roztwór podstawowy).

Z tego roztworu przygotować następujące rozcieńczenia:

1. 2,0 mL roztworu podstawowego + 8,0 mL wody
2. 4,0 mL roztworu podstawowego + 6,0 mL wody
3. 6,0 mL roztworu podstawowego + 4,0 mL wody
4. 8,0 mL roztworu podstawowego + 2,0 mL wody
5. 10,0 mL roztworu podstawowego + 0,0 mL wody

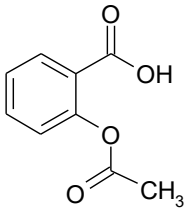
Do każdego z otrzymanych roztworów dodać 1,0 mL 5% (50 g/L) roztworu $FeCl_3$.
Ograniczyć dostęp światła i po około 5 minutach dokonać pomiaru kolorymetrycznego przy długości fali 530 nm wobec roztworu 10,0 mL wody z dodatkiem 1,0 mL 5% (50 g/L) roztworu $FeCl_3$ jako odnośnika. Wykreślić krzywą wzorcową.



<u>Oznaczanie preparatu o nieznanej zawartości</u>

Odważyć dokładnie około 0,10 g substancji badanej do kolby miarowej poj. 100,0 mL, rozpuścić i dopełnić 0,1 mol/L HCl.
Pobrać 5 mL tego roztworu, dodać 5,0 mL wody i dodać 1,0 mL 5% r-ru $FeCl_3$.
Ograniczyć dostęp światła i po około 5 minutach dokonać pomiaru kolorymetrycznego przy długości fali 530 nm wobec roztworu 10,0 mL wody z dodatkiem 1,0 mL 5% (50 g/L) roztworu $FeCl_3$ jako odnośnika. Odczytać stężenie z krzywej kalibracji.

KWAS ACETYLOSALICYLOWY



$C_9H_8O_4$ m.cz. 180,2

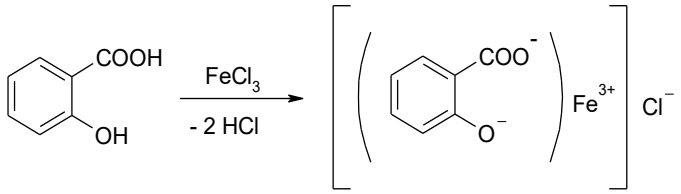
Kwas 2-acetoksybenzoesowy

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Odważyć dokładnie ok. 0,2 g substancji wzorcowej do kolby stożkowej poj. 250 mL, dodać 40,0 mL 15% roztworu NaOH i ogrzewać do wrzenia pod chłodnicą powietrzną przez 20 min. Roztwór ostudzić, zakwasić 25% HCl, przenieść ilościowo do kolby miarowej poj. 1000,0 mL i uzupełnić wodą.
Z roztworu przygotować następujące rozcieńczenia:

1. 20,0 ml roztworu + 0 ml wody
2. 15,0 ml roztworu + 5,0 ml wody
3. 10,0 ml roztworu + 10,0 ml wody
4. 5,0 ml roztworu + 15,0 ml wody
5. 2,5 ml roztworu + 17,5 ml wody

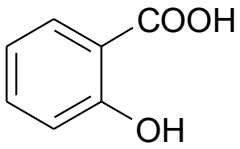
Otrzymane roztwory wytrząsnąć trzykrotnie z 20,0 mL eteru dietylowego, połączone wyciągi eterowe przemyć 20,0 mL wody. Warstwę eterową wytrząsnąć dwukrotnie po 20 mL 0,01 mol/L roztworu NaOH. Wodne, alkaliczne ekstrakty przenieść do kolby miarowej poj. 50,0 mL dodać 1 kroplę fenoloftaleiny, zakwasić dodając kroplami 5% HCl do odbarwienia. Kolby uzupełnić wodą. Do każdej dodać 2,0 mL 0,5% roztworu chlorku żelaza(III) i natychmiast dokonać pomiaru przy długości fali 530 nm wobec odnośnika, którym jest mieszanina 25,0 mL wody + 1,0 mL 0,5% roztworu $FeCl_3$. Wykreślić krzywą wzorcową.



Oznaczanie preparatu o nieznanej zawartości

Odważyć dokładnie ok. 0,15 g substancji badanego do kolby stożkowej poj. 250 mL, dodać 40,0 mL 15% roztworu NaOH i ogrzewać do wrzenia pod chłodnicą powietrzną przez 20 min. Roztwór ostudzić, zakwasić 25% HCl, przenieść ilościowo do kolby miarowej poj. 1000,0 mL i uzupełnić wodą. Pobrać 20,0 mL i poddać ekstrakcji eterem dietylowym jak opisano w przypadku krzywej wzorcowej. Wodne, alkaliczne ekstrakty przenieść do kolby miarowej poj. 50,0 mL dodać 1 kroplę fenoloftaleiny, zakwasić dodając kroplami 5% HCl do odbarwienia. Kolby uzupełnić wodą. Do każdej dodać 2,0 mL 0,5% roztworu chlorku żelaza(III) i natychmiast dokonać pomiaru przy długości fali 530 nm wobec odnośnika, którym jest mieszanina 25,0 mL wody + 1,0 mL 0,5% roztworu $FeCl_3$. Zmierzyć absorbancję i odczytać stężenie z krzywej wzorcowej.

KWAS SALICYLOWY



$C_7H_6O_3$ m.cz. 138.12

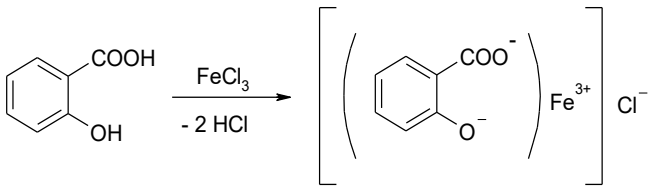
Kwas 2-hydroksybenzoesowy

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Odważyć dokładnie ok. 0,15 g substancji wzorcowej i uzupełnić wodą w kolbie miarowej poj. 100,0 mL. Pobrać 5,0 mL tego roztworu przenieść do kolby miarowej poj. 100,0 mL i uzupełnić wodą (roztwór podstawowy).
Z roztworu podstawowego przygotować następujące rozcieńczenia:

1. 9,0 mL roztworu + 16,0 mL wody
2. 13,0 mL roztworu + 12,0 mL wody
3. 17,0 mL roztworu + 8,0 mL wody
4. 21,0 mL roztworu + 4,0 mL wody
5. 25,0 mlL roztworu + 0,0 mL wody

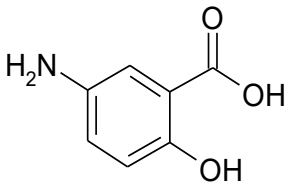
Do każdego z otrzymanych roztworów dodać 1,0 mL 0,5% roztworu $FeCl_3$ i natychmiast dokonać pomiaru przy długości fali 530 nm wobec odnośnika, którym jest mieszanina 25,0 mL wody + 1,0 mL 0,5% roztworu $FeCl_3$. Wykreślić krzywą wzorcową.



Oznaczanie preparatu o nieznanej zawartości.

Odważyć dokładnie ok. 0,13 g substancji badanej, rozpuścić w wodzie destylowanej w kolbie miarowej poj. 100,0 mL. Pobrać 5,0 mL tego roztworu przenieść do kolby miarowej poj. 100,0 mL i uzupełnić wodą destylowaną. Pobrać 25,0 mL tego roztworu, dodać 1,0 mL 0,5% roztworu $FeCl_3$ i natychmiast dokonać pomiaru absorbancji.
Odczytać zawartość z krzywej wzorcowej.

MESALAZYNA



$C_7H_7NO_3$ m.cz. 153,1

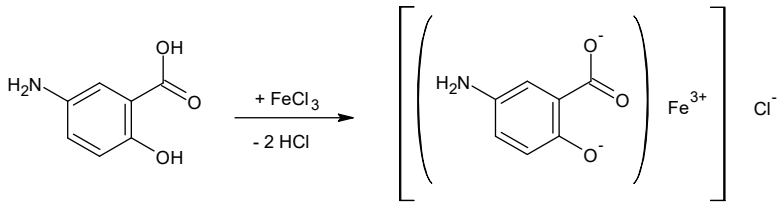
Kwas 5-amino-2-hydroksybenzoesowy

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Odważyć dokładnie ok. 0,10 g wzorcowej mesalazyny, rozpuścić w 100,0 mL wrzącej wody. Po ochłodzeniu przenieść ilościowo 50,0 mL tego roztworu do kolby miarowej o pojemności 500,0 mL i uzupełnić wodą.
Z tego roztworu pobrać kolejno:

1. 20,0 mL roztworu + 5,0 mL wody
2. 15,0 mL roztworu + 10,0 mL wody
3. 10,0 mL roztworu + 15,0 mL wody
4. 5,0 mL roztworu + 20,0 mL wody
5. 2,5 mL roztworu + 22,5 mL wody

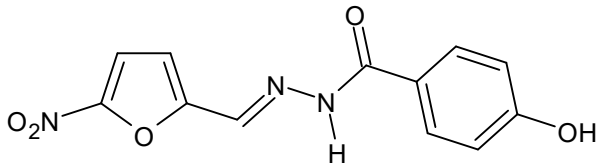
Do każdego z powyższych roztworów wzorcowych dodać 1,0 mL 0,5% roztworu $FeCl_3$ i dokonać pomiaru absorpcji wobec roztworu porównawczego – woda destylowana z roztworem $FeCl_3$ (0,5%) w stosunku 25:1 (v/v). Wykreślić krzywą wzorcową przy długości fali 530 nm.



Oznaczanie preparatu o nieznanej zawartości

Odważyć dokładnie ok. 0,1 g substancji badanej do kolby miarowej poj. 100,0 mL i rozpuścić we wrzącej wodzie. Po ochłodzeniu i uzupełnieniu wodą pobrać 5,0 mL roztworu i uzupełnić wodą w kolbie miarowej do 100,0 mL. Pobrać 25,0 mL tego roztworu i dodać 1,0 mL 0,5% roztworu $FeCl_3$. Zmierzyć absorbancję przy 530 nm i odczytać stężenie z krzywej wzorcowej [16].

NIFUROKSAZYD



$C_{12}H_9N_3O_5$ m.cz. 275,22

4-Hydroksy-N-[(5-nitrofuran-2-ylo)metylidenoamino]benzamid

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Odważyć dokładnie ok. 0,30 g substancji wzorcowej, rozpuścić w kolbie miarowej poj. 100,0 mL i uzupełnić metanolem (jeśli to konieczne użyć łaźni ultradźwiękowej do rozpuszczenia substancji) – roztwór podstawowy.
Przygotować następujące rozcieńczenia:

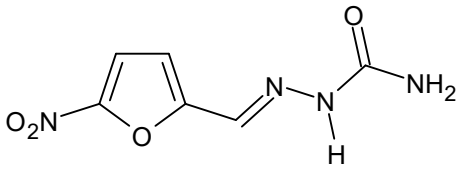
1. 0,3 mL roztworu + 9,7 mL metanolu
2. 0,5 mL roztworu + 9,5 mL metanolu
3. 0,8 mL roztworu + 9,2 mL metanolu
4. 1,5 mL roztworu + 8,5 mL metanolu
5. 2,0 mL roztworu + 8,0 mL metanolu

Dokonać pomiaru absorbancji przy 370 nm stosując metanol jako odnośnik. Wykreślić krzywą wzorcową.

Oznaczanie preparatu o nieznanej zawartości

Odważyć dokładnie ok. 0,3 g preparatu badanego, rozpuścić w metanolu w kolbie miarowej poj. 100,0 mL. Pobrać 1,0 mL roztworu i uzupełnić metanolem do 10,0 mL. Zmierzyć absorbancję przy 370 nm i odczytać stężenie z krzywej wzorcowej.

NITROFURAZON



$C_6H_6N_4O_4$ m.cz. 198,14

[(5-Nitrofuran-2-ylo)metylidenoamino]mocznik

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Odważyć dokładnie ok. 0,10 g substancji wzorcowej, rozpuścić w kolbie miarowej poj. 100,0 mL i uzupełnić acetonem (jeśli to konieczne użyć łaźni ultradźwiękowej do rozpuszczenia substancji) – roztwór podstawowy.
Przygotować następujące rozcieńczenia:

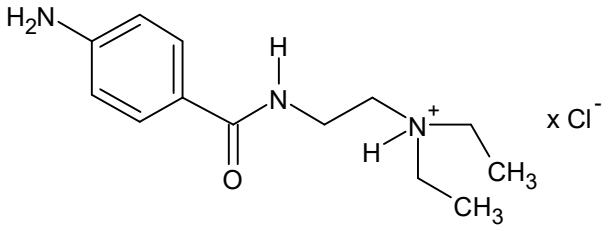
1. 0,1 mL roztworu + 9,9 mL acetonu
2. 0,2 mL roztworu + 9,8 mL acetonu
3. 0,3 mL roztworu + 9,7 mL acetonu
4. 0,4 mL roztworu + 9,6 mL acetonu
5. 0,5 mL roztworu + 9,5 mL acetonu

Dokonać pomiaru absorbancji przy 422 nm stosując aceton jako odnośnik. Wykreślić krzywą wzorcową.

Oznaczanie preparatu o nieznanej zawartości

Odważyć dokładnie ok. 0,10 g preparatu badanego, rozpuścić w acetonie w kolbie miarowej poj. 100,0 mL. Pobrać 0,3 mL roztworu i uzupełnić acetonem do 10,0 mL. Zmierzyć absorbancję przy 422 nm i odczytać stężenie z krzywej wzorcowej.

PROKAINAMIDU CHLOROWODOREK



$C_{13}H_{22}ClN_3O$ m.cz. 271,78

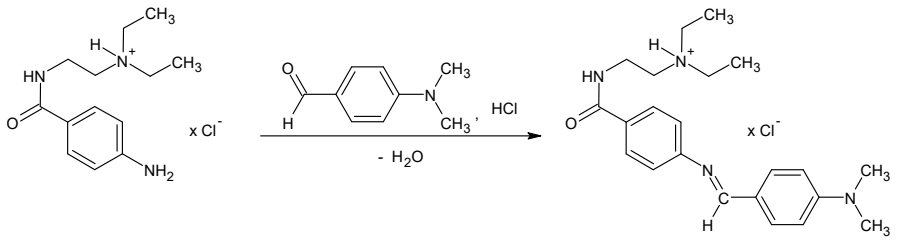
Chlorowodorek 4-amino-N-[2-(dietyloamino)etylo]benzamidu

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Odważyć dokładnie ok. 0,250 g substancji wzorcowej, rozpuścić w kolbie miarowej poj. 50,0 mL i uzupełnić wodą. 2,0 mL tego roztworu przenieść do kolby miarowej na 100,0 mL. Przed całkowitym uzupełnieniem zobojętnić roztwór wobec fenoloftaleiny 0,1 mol/L HCl lub 0,1 mol/L roztworem NaOH do lekko różowego zabarwienia i uzupełnić wodą destylowaną.
Przygotować następujące rozcieńczenia:

1. 2,0 mL roztworu + 8,0 mL wody
2. 3,0 mL roztworu + 7,0 mL wody
3. 4,0 mL roztworu + 6,0 mL wody
4. 5,0 mL roztworu + 5,0 mL wody
5. 6,0 mL roztworu + 4,0 mL wody

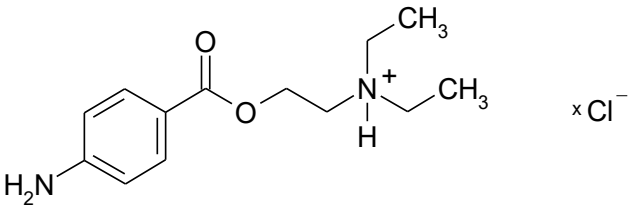
Do każdego z otrzymanych roztworów dodać 10,0 mL 1% aldehydu *p*-dimetyloaminobenzoesowego w 0,1 mol/L HCl i po około 3 minutach dokonać pomiaru absorbancji przy 420 nm stosując 1% roztwór aldehydu *p*-dimetyloaminobenzoesowego w 0,1 mol/L HCl jako odnośnik. Wykreślić krzywą wzorcową.



Oznaczanie preparatu o nieznanej zawartości

Odważyć dokładnie ok. 0,15 g preparatu badanego, rozpuścić w wodzie destylowanej w kolbie miarowej poj. 100,0 mL. 2,0 mL tego roztworu przenieść do kolby miarowej poj. 100,0 mL. Przed całkowitym uzupełnieniem zobojętnić roztwór wobec fenoloftaleiny 0,1 mol/L HCl lub 0,1 mol/L roztworem NaOH do lekko różowego zabarwienia. Pobrać 10,0 mL tego roztworu, dodać 10,0 mL 1% roztworu aldehydu *p*-dimetyloaminobenzoesowego w 0,1 mol/L HCl i po około 3 minutach dokonać pomiaru. Zmierzyć absorbancję przy 420 nm i odczytać stężenie z krzywej wzorcowej.

PROKAINY CHLOROWODOREK



$C_{13}H_{21}ClN_2O_2$ m.cz. 272,8

Chlorowodorek 4-aminobenzoesanu 2-dietyloaminoetylu

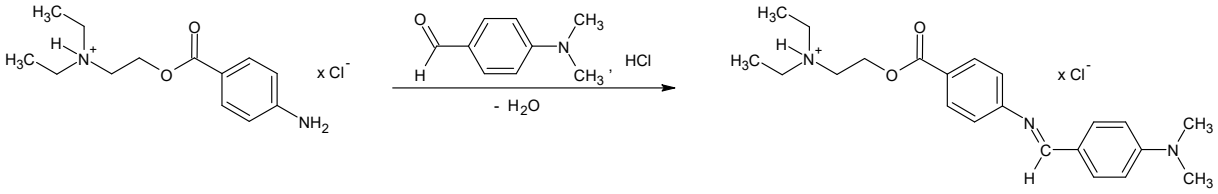
Wykreślenie krzywej wzorcowej

Odważyć dokładnie ok. 0,250 g substancji badanej, rozpuścić w kolbie miarowej poj. 50,0 mL i uzupełnić wodą destylowaną. 2,0 mL tego roztworu przenieść do kolby miarowej poj. 100,0 mL. Przed całkowitym uzupełnieniem zobojętnić roztwór wobec fenoloftaleiny 0,1 mol/L HCl lub 0,1 mol/L roztworem NaOH do lekko różowego zabarwienia i uzupełnić wodą destylowaną.
Przygotować następujące rozcieńczenia:

1. 2,0 mL roztworu + 8,0 mL wody
2. 3,0 mL roztworu + 7,0 mL wody
3. 4,0 mL roztworu + 6,0 mL wody

4. 5,0 mL roztworu + 5,0 mL wody
5. 6,0 mL roztworu + 4,0 mL wody

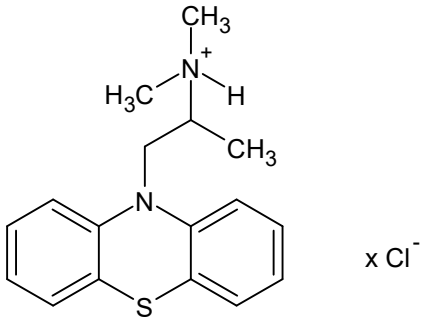
Do każdego z otrzymanych roztworów dodać 10,0 mL 1% roztworu aldehydu p-dimetyloaminobenzoesowego w 0,1 mol/L HCl i po około 3 minutach dokonać pomiaru absorbancji przy 420 nm stosując 1% roztwór aldehydu p-dimetyloaminobenzoesowego w 0,1 mol/L HCl jako odnośnik. Wykreślić krzywą wzorcową.



Oznaczanie preparatu o nieznanej zawartości

Odważyć dokładnie ok. 0,150 g preparatu badanego, rozpuścić w wodzie destylowanej w kolbie miarowej poj. 100,0 mL. 2,0 mL tego roztworu przenieść do kolby miarowej poj. 100,0 mL. Przed całkowitym uzupełnieniem zobojętnić roztwór wobec fenoloftaleiny 0,1 mol/L HCl lub 0,1 mol/L roztworem NaOH do lekko różowego zabarwienia. Pobrać 10,0 mL tego roztworu, dodać 10,0 ml 1% roztworu aldehydu *p*-dimetyloaminobenzoesowego w 0,1 mol/L HCl i po około 3 minutach dokonać pomiaru. Zmierzyć absorbancję przy 420 nm i odczytać stężenie z krzywej wzorcowej.

PROMETAZYNY CHLOROWODOREK



$C_{17}H_{21}N_2ClS$ m.cz. 320,9

Chlorowodorek N,N-dimetylo-1-fenotiazyn-10-ylopropan-2-aminy

Wykreślenie krzywej wzorcowej

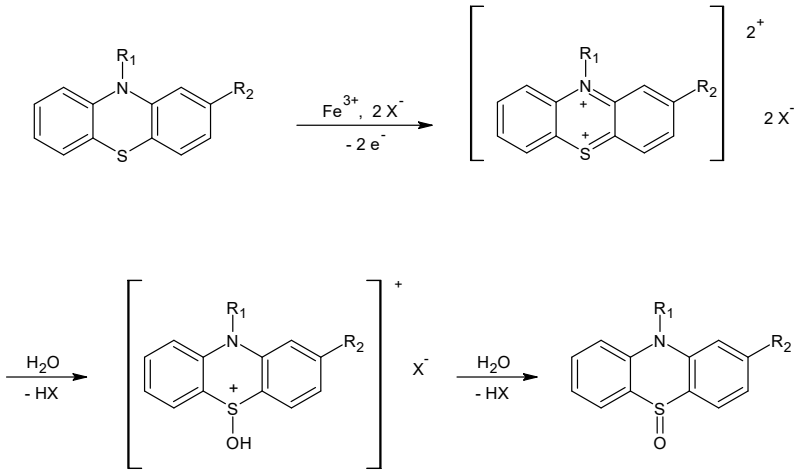
Odważyć dokładnie ok. 0,10 g substancji wzorcowej do kolby miarowej o poj. 100,0 mL, rozpuścić i dopełnić 0,1 mol/L HCl (roztwór podstawowy).

Z tego roztworu przygotować następujące rozcieńczenia:

1. 2,0 mL roztworu podstawowego + 8,0 mL wody
2. 4,0 mL roztworu podstawowego + 6,0 mL wody
3. 6,0 mL roztworu podstawowego + 4,0 mL wody

4. 8,0 mL roztworu podstawowego + 2,0 mL wody
5. 10,0 mL roztworu podstawowego + 0,0 mL wody

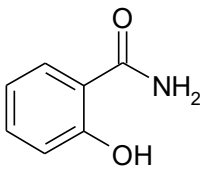
Do każdego z otrzymanych roztworów dodać 1,0 mL 5% (50 g/L) roztworu $FeCl_3$.
Ograniczyć dostęp światła i po około 5 minutach dokonać pomiaru kolorymetrycznego przy długości fali 530 nm wobec roztworu 10,0 mL wody z dodatkiem 1,0 mL 5% (50 g/L) roztworu $FeCl_3$ jako odnośnika. Wykreślić krzywą wzorcową.



<u>Oznaczanie preparatu o nieznanej zawartości</u>

Odważyć dokładnie około 0,10 g substancji badanej do kolby miarowej poj. 100,0 mL, rozpuścić i dopełnić 0,1 mol/L HCl. Pobrać 5 mL tego roztworu, dodać 5,0 mL wody i dodać 1,0 mL 5% roztworu $FeCl_3$.
Ograniczyć dostęp światła i po około 5 minutach dokonać pomiaru kolorymetrycznego przy długości fali 530 nm wobec roztworu 10,0 mL wody z dodatkiem 1,0 mL 5% (50 g/L) roztworu $FeCl_3$ jako odnośnika. Odczytać stężenie z krzywej kalibracji.

SALICYLAMID



$C_7H_7NO_2$ m.cz. 137,1

2-Hydroksybenzamid

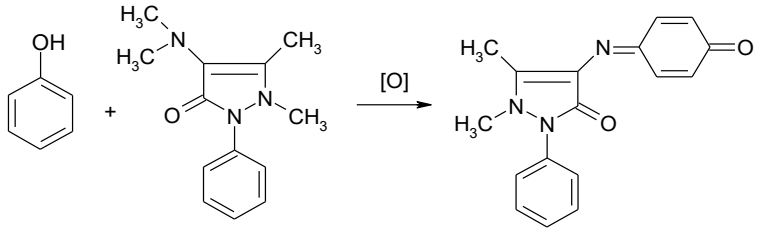
<u>Wykreślenie krzywej wzorcowej</u>

Odważyć dokładnie ok. 0,25 g substancji wzorcowej i uzupełnić wodą w kolbie miarowej poj. 250,0 mL. Pobrać 2,5 mL tego roztworu przenieść do kolby miarowej poj. 100,0 mL i uzupełnić wodą.

Przygotować następujące rozcieńczenia:

1. 2,0 mL roztworu + 8,0 mL wody
2. 4,0 mL roztworu + 6,0 mL wody
3. 6,0 mL roztworu + 4,0 mL wody
4. 8,0 mL roztworu + 2,0 mL wody
5. 10,0 mL roztworu + 0,0 mL wody

Do 1,0 mL każdego z otrzymanych roztworów dodać 1,0 mL buforu amonowego o pH 8,0, 1,0 mL 1% roztworu aminofenazonu i 1,0 mL 2% roztworu $K_3Fe(CN)_6$. Po 30 min. zmierzyć absorbancję przy 500 nm wobec mieszaniny zawierającej 1,0 mL wody, 1,0 mL buforu amonowego o pH 8,0, 1,0 mL 1% roztworu aminofenazonu i 1,0 mL 2% $K_3Fe(CN)_6$. Wykreślić krzywą wzorcową.

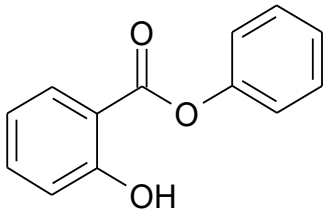


Oznaczanie preparatu o nieznanej zawartości.

Odważyć dokładnie ok. 0,15 g substancji badanej, rozpuścić w wodzie w kolbie miarowej poj. 250,0 mL. Pobrać 2,5 mL tego roztworu i uzupełnić w kolbie miarowej poj. 100,0 mL. Pobrać 1,0 mL tego roztworu, dodać 1,0 mL buforu amonowego o pH 8,0, 1,0 mL 1% roztworu aminofenazonu i 1,0 mL 2% $K_3Fe(CN)_6$. Po ok. 30 minutach dokonać pomiaru absorpcji. Odczytać stężenie z krzywej wzorcowej.

UWAGA: istotna jest kolejność dodawanych odczynników. $K_3Fe(CN)_6$ należy przygotować ex tempore.

SALICYLAN FENYLU



$C_{13}H_{10}O_3$ m.cz.214.22

2-Hydroksybenzoesan fenylu

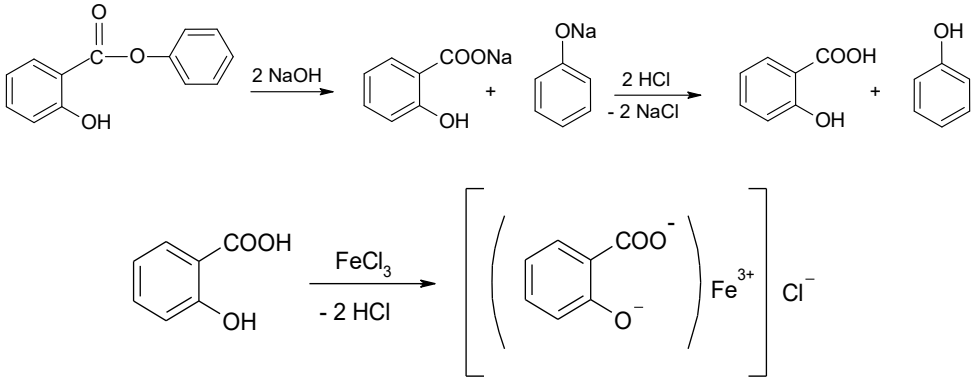
Wykreślenie krzywej wzorcowej

Odważyć dokładnie ok. 0,1 g substancji wzorcowej do kolby stożkowej poj. 200 mL, dodać 20 mL 15% roztworu NaOH i utrzymywać we wrzeniu przez 20 min pod

chłodnicą powietrzną. Roztwór ostudzić, przenieść ilościowo do kolby miarowej poj. 500,0 mL i uzupełnić wodą.
Przygotować następujące rozcieńczenia:

1. 20,0 mL roztworu + 0,0 mL wody
2. 15,0 mL roztworu + 5,0 mL wody
3. 10,0 mL roztworu + 10,0 mL wody
4. 5,0 mL roztworu + 15,0 mL wody
5. 2,5 mL roztworu + 17,5 mL wody

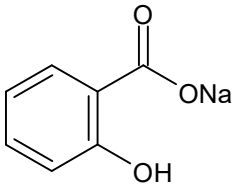
Otrzymane roztwory wytrząsnąć z 20 mL eteru dietylowego. Warstwę wodną odrzucić. Warstwę eterową wytrząsać dwukrotnie z 20 mL 0,01 mol/L roztworu NaOH. Wyciągi alkaliczne przenieść do kolb miarowych poj. 50,0 mL, dodać 1 kroplę fenoloftaleiny i ostrożnie zakwasić 15% HCl do odbarwienia fenoloftaleiny. Uzupełnić wodą. Do każdego z otrzymanych roztworów dodać 2,0 mL 0,5% roztworu $FeCl_3$ i natychmiast dokonać pomiaru absorbancji przy 530 nm wobec mieszaniny 50,0 mL wody i 2,0 mL 0,5% roztworu $FeCl_3$. Wykreślić krzywą wzorcową.



<u>Oznaczanie preparatu o nieznanej zawartości.</u>

Odważyć dokładnie ok. 0,1 g substancji badanej do kolby stożkowej poj. 200 mL, dodać 20 mL 15% roztworu NaOH i utrzymywać we wrzeniu przez 20 min pod chłodnicą powietrzną. Roztwór ostudzić, przenieść ilościowo do kolby miarowej poj. 500,0 mL i uzupełnić wodą. Pobrać 20,0 mL tego roztworu i wytrząsać z 20 mL eteru dietylowego. Warstwę wodną odrzucić. Warstwę eterową wytrząsnąć dwukrotnie z 20 mL 0,01 mol/L roztworu NaOH. Wyciągi alkaliczne przenieść do kolb miarowych poj. 50,0 mL, dodać 1 kroplę fenoloftaleiny i ostrożnie zakwasić 15% HCl do odbarwienia fenoloftaleiny. Uzupełnić wodą. Do otrzymanego roztworu dodać 2,0 mL 0,5% roztworu $FeCl_3$ i natychmiast dokonać pomiaru absorbancji przy 530 nm wobec mieszaniny 50,0 mL wody i 2,0 mL 0,5% roztworu $FeCl_3$. Odczytać stężenie z krzywej wzorcowej.

SALICYLAN SODU



$C_7H_5NaO_3$ m.cz. 160,1

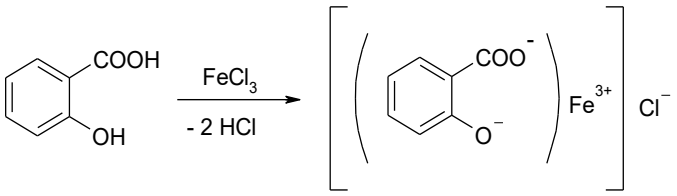
2-Hydroksybenzoesan sodu

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Odważyć dokładnie ok. 0,150 g substancji wzorcowej i rozpuścić w 100,0 mL wody destylowanej w kolbie miarowej. 5,0 mL tego roztworu przenieść do kolby miarowej poj. 100,0 mL, dodać 0,6 mL 0,1 mo/L HCl i uzupełnić wodą destylowaną.
Przygotować następujące rozcieńczenia:

1. 9,0 mL roztworu + 16,0 mL wody
2. 13,0 mL roztworu + 12,0 mL wody
3. 17,0 mL roztworu + 8,0 mL wody
4. 21,0 mL roztworu + 4,0 mL wody
5. 25,0 mL roztworu + 0,0 mL wody

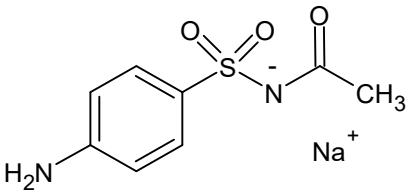
Do każdego z otrzymanych roztworów dodać 1,0 mL 0,5% roztworu $FeCl_3$ i natychmiast dokonać pomiaru absorbancji przy 530 nm wobec mieszaniny 25,0 mL wody i 1,0 mL 0,5% roztworu $FeCl_3$. Wykreślić krzywą wzorcową.



Oznaczanie preparatu o nieznanej zawartości salicylanu sodu

Odważyć dokładnie ok. 0,1 g preparatu badanego, rozpuścić w wodzie destylowanej w kolbie miarowej poj. 100,0 mL. 5,0 mL tego roztworu przenieść do kolby miarowej poj. 100,0 mL, dodać 0,6 mL 0,1 mol/L HCl i uzupełnić wodą destylowaną. Pobrać 25,0 mL tego roztworu, dodać 1,0 mL 0,5% roztworu $FeCl_3$ i natychmiast dokonać pomiaru przy 530 nm. Odczytać stężenie z krzywej wzorcowej.

SULFACETAMID SODU



$C_8H_{11}N_2NaO_4S$ m.cz. 254,24

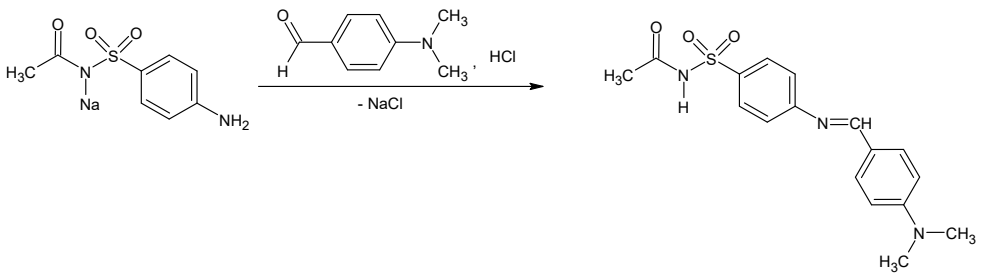
N-(4-aminofenylosulfonylo)acetamid sodu

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Odważyć dokładnie ok. 0,05 g substancji wzorcowej, rozpuścić w 50,0 mL 0,1 mol/L HCl w kolbie miarowej (roztwór podstawowy).
Przygotować następujące rozcieńczenia w probówkach miarowych:

1. 0,5 mL roztworu podstawowego + 9,5 mL 0,1 mol/L HCl
2. 1,0 mL roztworu podstawowego + 9,0 mL 0,1 mol/L HCl
3. 2,0 mL roztworu podstawowego + 8,0 mL 0,1 mol/L HCl
4. 3,0 mL roztworu podstawowego + 7,0 mL 0,1 mol/L HCl
5. 5,0 mL roztworu podstawowego + 5,0 mL 0,1 mol/L HCl

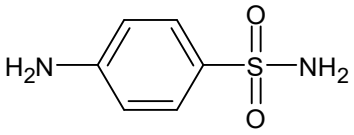
Do każdego z otrzymanych roztworów dodać 10,0 mL 1% roztworu aldehydu p-dimetyloaminobenzoesowego w 10% HCl i po około 5 minutach dokonać pomiaru absorbancji przy 455 nm stosując 1% roztwór aldehydu p-dimetyloaminobenzoesowego w 10% HCl jako odnośnik. Wykreślić krzywą wzorcową.



Oznaczanie preparatu o nieznanej zawartości sulfacetamidu sodu

Odważyć dokładnie ok. 0,05 g badanego preparatu, rozpuścić w 50,0 ml 0,1 mol/L HCl, w kolbie miarowej. Pobrać 2,0 mL tego roztworu do probówki miarowej Egzerta i dopełnić do 10,0 mL 0.1mol/L HCl. Następnie dodać 10,0 mL 1% roztworu DMABA w 10% HCl. Odczekać 5 minut, bezpośrednio przed pomiarem zamieszać. Dokonać pomiaru przy analitycznej długości fali równej 455 nm w odniesieniu do ślepej próby.
Metodę opracowali studenci SKN „Lek” Zuzanna Litwińska i Norbert Patalas

SULFANILAMID



$C_6H_8N_2O_2S$ m.cz. 172,21

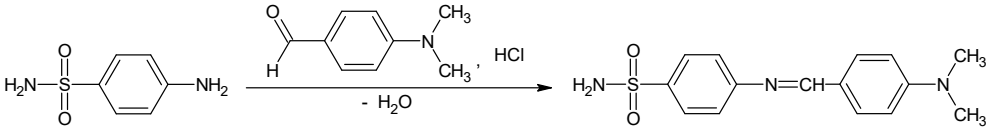
4-Aminobenzenosulfonamid

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Odważyć dokładnie ok. 0,3 g substancji wzorcowej, rozpuścić w wodzie w kolbie miarowej poj. 100,0 mL i uzupełnić wodą. Przed uzupełnieniem zobojętnić roztwór wobec fenoloftaleiny do lekko różowego zabarwienia. Pobrać 5,0 mL tego roztworu i uzupełnić wodą do 100,0 mL.
Z tego roztworu sporządzić następujące rozcieńczenia:

1. 2,0 mL roztworu + 8,0 mL wody
2. 3,0 mL roztworu + 7,0 mL wody
3. 4,0 mL roztworu + 6,0 mL wody
4. 5,0 mL roztworu + 5,0 mL wody
5. 6,0 mL roztworu + 4,0 mL wody.

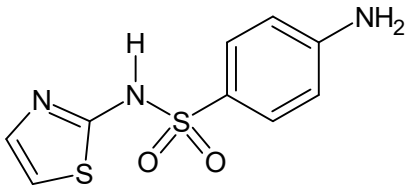
Do każdego z otrzymanych roztworów dodać 10,0 mL 0,1% roztworu aldehydu p-dimetyloaminobenzoesowego w 0,1 mol/L HCl i po ok. 3 min. dokonać pomiaru absorbancji przy 420 nm wobec mieszaniny 10,0 mL wody i 10,0 mL 0,1% roztworu aldehydu p-dimetyloaminobenzoesowego w 0,1 mol/L HCl. Wykreślić krzywą wzorcową.



Oznaczanie preparatu o nieznanej zawartości

Odważyć dokładnie ok. 0,18 g substancji badanej, rozpuścić w wodzie, w kolbie miarowej poj. 100,0 mL i uzupełnić wodą. Przed uzupełnieniem zobojętnić roztwór wobec fenoloftaleiny do lekko różowego zabarwienia. Pobrać 5,0 mL tego roztworu i uzupełnić wodą do 100,0 mL. Pobrać 10,0 mL tego roztworu, dodać 10,0 mL 0,1% roztworu aldehydu p-dimetyloaminobenzoesowego w 0,1 mol/L HCl i po ok. 3 min. dokonać pomiaru absorbancji przy 420 nm wobec mieszaniny 10,0 mL wody i 10,0 mL 0,1% roztworu aldehydu p-dimetyloaminobenzoesowego w 0,1 mol/L HCl. Zmierzyć absorbancję i odczytać stężenie z krzywej wzorcowej.

SULFATIAZOL



$C_9H_9N_3O_2S_2$ m.cz. 255,3

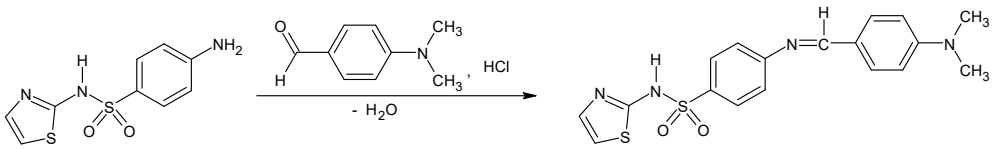
4-Amino-N-(1,3-tiazol-2-ilo)benzenosulfonamid

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Odważyć dokładnie ok. 0,10 g substancji wzorcowej do kolby miarowej poj. 100,0 mL i rozpuścić w 0,1 mol/L HCl (roztwór podstawowy).
Z tego roztworu przygotować następujące rozcieńczenia:

1. 1,0 mL + 9,0 mL 0,1 mol/L HCl
2. 2,0 mL + 8,0 mL 0,1 mol/L HCl
3. 3,0 mL + 7,0 mL 0,1 mol/L HCl
4. 4,0 mL + 6,0 mL 0,1 mol/L HCl
5. 5,0 mL + 5,0 mL 0,1 mol/L HCl

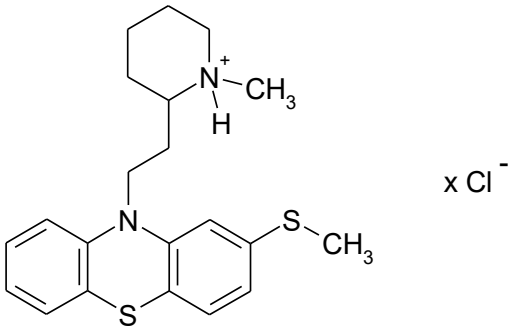
Do każdego z tak przygotowanych roztworów dodać 10,0 mL 1% roztworu DMABA w 10% HCl. Dokonać pomiaru absorbancji przy 452 nm stosując jako odnośnik mieszaninę 10,0 mL 0,1 mol/L HCl i 10,0 mL 1% roztworu DMABA w 10% HCl. Wykreślić krzywą wzorcową.



Oznaczanie preparatu o nieznanej zawartości.

Odważyć dokładnie ok. 0,10 g substancji badanej do kolby miarowej poj. 100,0 mL i rozpuścić w 0,1 mol/L HCl. Z roztworu pobrać 3,0 mL i dopełnić 0,1 mol/L HCl do 10,0 mL. Do roztworu dodać 10,0 mL 1% roztworu DMABA w 10% HCl. Zmierzyć absorbancję przy 452 nm i odczytać zawartość z krzywej wzorcowej, stosując mieszaninę 10,0 mL 0,1 mol/L HCl i 10,0 mL roztworu DMABA jako odnośnik.

TIORYDAZYNY CHLOROWODOREK



$C_{21}H_{27}ClN_2S_2$ m.cz. 407,0

Chlorowodorek 10-[2-(1-metylopiperydyn-2-ylo)etylo]-2-metylosulfanylo-fenotiazyny

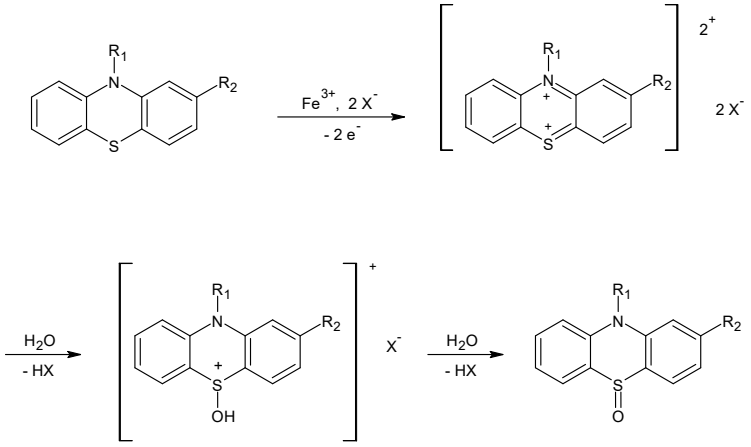
Wykreślenie krzywej wzorcowej

Odważyć dokładnie ok. 0,10 g substancji wzorcowej do kolby miarowej o poj. 100,0 mL, rozpuścić i dopełnić 0,1 mol/L HCl (roztwór podstawowy).

Z tego roztworu przygotować następujące rozcieńczenia:

1. 2,0 mL roztworu podstawowego + 8,0 mL wody
2. 4,0 mL roztworu podstawowego + 6,0 mL wody
3. 6,0 mL roztworu podstawowego + 4,0 mL wody
4. 8,0 mL roztworu podstawowego + 2,0 mL wody
5. 10,0 mL roztworu podstawowego + 0,0 mL wody

Do każdego z otrzymanych roztworów dodać 1,0 mL 5% (50 g/L) roztworu $FeCl_3$. Ograniczyć dostęp światła i po około 5 minutach dokonać pomiaru kolorymetrycznego przy długości fali 530 nm wobec roztworu 10,0 mL wody z dodatkiem 1,0 mL 5% (50 g/L) roztworu $FeCl_3$ jako odnośnika. Wykreślić krzywą wzorcową.



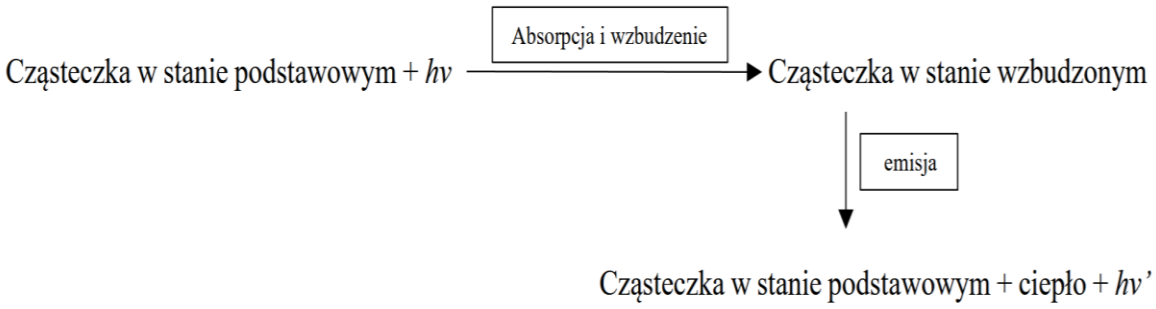
Oznaczanie preparatu o nieznanej zawartości

Odważyć dokładnie około 0,10 g substancji badanej do kolby miarowej poj. 100,0 mL, rozpuścić i dopełnić 0,1 mol/L HCl.

Pobrać 5 mL tego roztworu, dodać 5,0 mL wody i dodać 1,0 mL 5% roztworu $FeCl_3$. Ograniczyć dostęp światła i po około 5 minutach dokonać pomiaru kolorymetrycznego przy długości fali 530 nm wobec roztworu 10,0 mL wody z dodatkiem 1,0 mL 5% (50 g/L) roztworu $FeCl_3$ jako odnośnika. Odczytać stężenie z krzywej kalibracji.

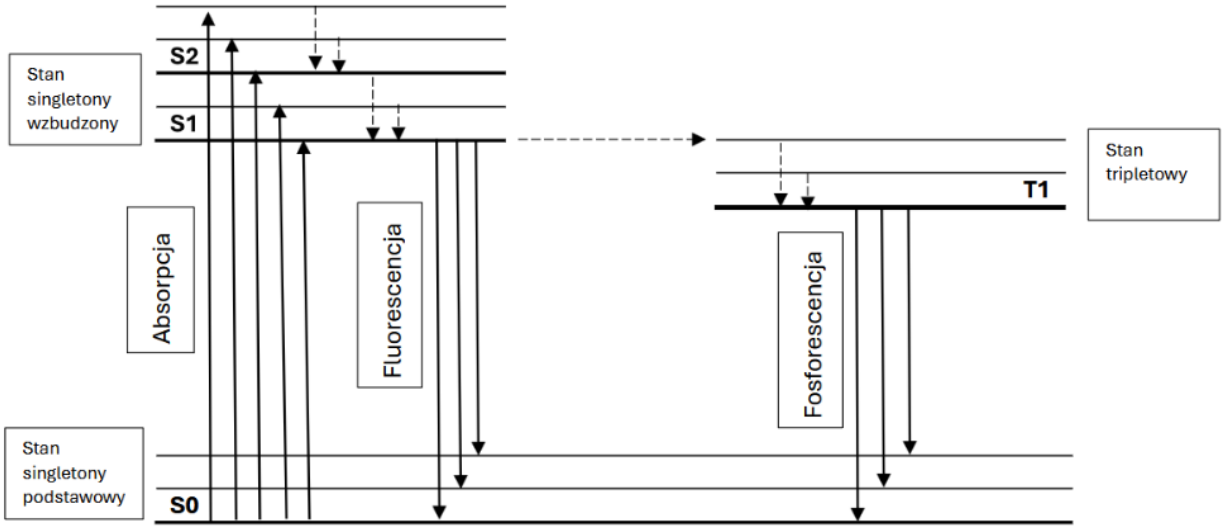
2. Metoda spektrofluorymetryczna [17–23]

Spektrofluorymetria (spektrometria fluorescencyjna cząsteczkowa, fluorymetria) jest zaliczana do metod emisyjnych cząsteczkowych. Niektóre substancje chemiczne (tzw. luminofory) mają zdolność emitowania promieniowania elektromagnetycznego po zaabsorbowaniu energii przez atomy lub cząsteczki danej substancji (patrz rys. 3). Jeżeli wzbudzenie cząsteczek występuje w wyniku promieniowania elektromagnetycznego w zakresie UV-VIS, a długość fali promieniowania emitowanego jest większa niż długość fali promieniowania wzbudzającego i leży w zakresie światła widzialnego to występuje **tzw. zjawisko fotoluminescencji**.



Rysunek 3. Schemat procesu fotoluminescencji

Emitowane promieniowanie ma niższą energię niż promieniowanie wzbudzające, ponieważ część pochłoniętej energii przez cząsteczkę może być oddawana w sposób bezpromienisty poprzez oddziaływania wewnątrzcząsteczkowe (relaksacja oscylacyjna) i międzycząsteczkowe (zderzenia z innymi cząsteczkami znajdującymi się w otoczeniu – energia oddawana w postaci ciepła). Rodzajem fotoluminescencji jest fluorescencja lub fosforescencja. Fluorescencję charakteryzuje krótki czas zaniku promieniowania po usunięciu źródła promieniowania wzbudzającego, trwający 10^{-9}s–10^{-7}s, natomiast fosforescencję charakteryzuje długi czas zaniku, trwający kilka sekund a nawet kilka minut. Te różnice wynikają z występujących odmiennych przejść elektronowych w fluorescencji i fosforescencji. Zmiany energii w cząsteczce powodujące oba procesy są przedstawiane schematycznie na diagramie Jabłońskiego.



Rysunek 4. Zmiany energii w cząsteczce w procesie fluorescencji i fosforescencji (opracowano na podstawie diagramu Aleksandra Jabłońskiego)

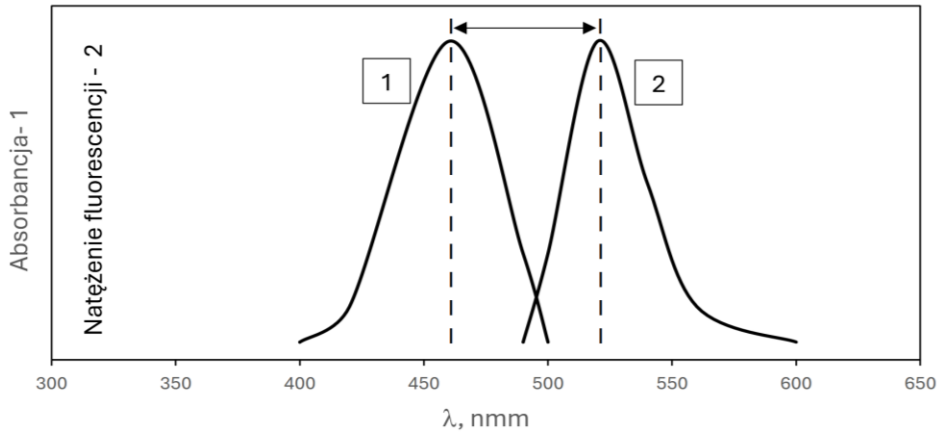
W cząsteczce występują określone dla niej poziomy energetyczne: elektronowe, oscylacyjne i rotacyjne, a energia elektronowa jest wielokrotnie większa od energii oscylacyjnej i rotacyjnej. Zgodnie ze schematem absorpcja promieniowania UV-VIS powoduje przejście cząsteczki ze stanów podstawowych S_0 (stan singletowy podstawowy) do stanów wzbudzonych elektronowo S_1–S_2 (stan singletowy wzbudzony), a następnie wzbudzona cząsteczka traci nadmiar energii rotacyjnej i oscylacyjnej w sposób bezpromienisty. W tym czasie elektrony z różnych podpoziomów przechodzą na najniższy podpoziom wzbudzony S_1. Czas trwania tego procesu wynosi 10^{-9}s–10^{-7}s. Emisja promieniowania elektromagnetycznego występuje, gdy elektrony przechodzą ze wzbudzonego stanu elektronowego S_1 na jeden z podpoziomów stanu podstawowego S_0. Występuje tutaj promieniowanie samorzutne odpowiadające fluorescencji. W przypadku fosforescencji, jak zaznaczono na diagramie, może występować dodatkowe przejście ze stanu wzbudzonego singletowego na wzbudzony stan tripletowy zanim nastąpi emisja promieniowania elektromagnetycznego. Czas trwania tego procesu jest dłuższy i wynosi 10^{-4}s–10^{4}s. Przejście tego typu nazywa się międzysystemowe (interkombinacyjne), jest wymuszone i mało prawdopodobne. Z powodu tego energia emitowanego promieniowania w procesie fosforescencji jest niższa niż fluorescencji, a długość fali jest jeszcze bardziej przesunięta w stronę dłuższych fal. Zjawisko fluorescencji wykorzystuje w analizie jakościowej m.in w badaniu tożsamości środków leczniczych, na przykład chlorowodorku i siarczanu chininy, chlorowodorku i azotanu tiaminy. Zjawisko fluorescencji wykorzystuje się także w metodach fluorymetrycznych stosowanych w analizie ilościowej związków organicznych i nieorganicznych. Metodami fluorymetrycznymi można oznaczać substancje w bardzo małych stężeniach (0,01 ppm). Metody te cechuje wysoka czułość i precyzja (RDS względne odchylenie standardowe ±1%). Lepsza selektywność tych metod w porównaniu z metodami spektrofotometrycznymi UV i VIS może wynikać z tego, że są oznaczane tylko substancje wykazujące fluorescencję oraz że można dokonywać odpowiedniego

doboru długości fali promieniowania wzbudzającego oraz promieniowania fluorescencyjnego. Metodą spektrofluorymetryczną można oznaczyć m.in. witaminę B_1 i B_2, tryptofan, tyrozynę, chininę i chinidynę oraz etakrydynę. Cechą wspólną tych związków jest ich sztywna struktura wynikająca z obecności aromatycznych karbo- lub heterocyklicznych pierścieni.

Spektrofluorymetria – praktyczna metoda oznaczania ilościowego

1. Wykreślanie widma

W metodzie fluorymetrycznej dokonuje się pomiaru natężenia promieniowania fluorescencyjnego emitowanego po wzbudzeniu oznaczanej substancji promieniowaniem o odpowiedniej długości fali. Aby dokonać wyboru analitycznej długości fali wykreśla się widmo. W fotoluminescencji występują charakterystyczne, lekko nałożone na siebie dwa widma: widmo absorpcji i widmo emisji. Widma wykazują pewną symetrię, pasma fluorescencji są zwierciadlanymi odbiciami pasm absorbcji względem prostej przecinającej prostopadle oś długości fali. Pełną symetrię obu widm obserwuje się tylko w nielicznych przypadkach. Porównując położenie obu widm, można zaobserwować, że widmo fluorescencyjne względem widma absorbcji jest przesunięte w stronę fal o większej długości, ponieważ jak już wspomniano występuje utrata części pochłoniętej energii.



Rysunek 5. Wykreślone widmo absorpcji (ekstynkcja) i emisji (λ_{ex} = 460 nmm; λ_{em} = 520)

Różnica pomiędzy maksimami pasm absorbcji i emisji nazywana jest **przesunięciem Stokesa**. Opisuje je następujące równanie:

$$\Delta E = hv_{ex} - hv_{em} = hc\left(\frac{1}{\lambda_{ex}} - \frac{1}{\lambda_{em}}\right)$$

Gdzie: hv_{ex} – częstotliwość fali absorbowanej,
hv_{em} – częstotliwość fali emitowanej,
h – stała Plancka.

Wartość przesunięcia Stokesa zależy nie tylko od właściwości cząsteczek fluorogennych ale także rozpuszczalnika, w którym się one znajdują. Rozpuszczalniki o dużej przenikalności elektrycznej i małej lepkości wpływają na zwiększenie wartości przesunięcia Stokesam [17,18,19]. Do oznaczeń ilościowych wybiera się długość fali odpowiadającą maksimum absorbcji λ_{ex} i długość fali odpowiadającą maksimum emisji λ_{em}.
Ważnymi parametrami, które mają wpływ na intensywność fluorescencji są wydajność kwantowa fluorescencji (Φ_{fl}) badanej cząsteczki i czas życia fluorescencji (τ_{fl}). Wydajność kwantową fluorescencji określa się jako stosunek liczby fotonów promieniowania wyemitowanego do liczby fotonów promieniowania wzbudzającego pochłoniętego przez roztwór badanej substancji, w tym samym czasie i tej samej objętości [19].

$$\Phi = \frac{I_{fl}}{I_{ab}}$$

gdzie $I_{fl} = \int_0^\infty I_{fl}\,(\lambda) d\lambda$

Natomiast czas życia fluorescencji to czas, w ciągu którego intensywność fluorescencji I_{fl} maleje do 1/e jej wartości początkowej I_0. Wydajność kwantową fluorescencji można wyznaczyć kilkoma metodami m.in. metodą bezpośrednią z wykorzystaniem aktynometru chemicznego, gdzie mierzy się natężenie promieniowania wzbudzającego i promieniowania emitowanego przez badaną substancję lub metodami z wykorzystaniem wzorca o znanej wydajności kwantowej fluorescencji [19,22].
Procesy powodujące zmniejszenie natężenia fluorescencji danej substancji nazywa się **wygaszaniem fluorescencji**, a czynniki je wywołujące określa się jako wygaszacze. Wygaszanie fluorescencji opisuje równanie Sterna-Volmera:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = \frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}\,[Q]$$

gdzie: $K_{sv} = k_q \cdot \tau_0$ jest tzw. stałą wygaszania Sterna-Volmera
F_0 – natężenie fluorescencji bez obecności wygaszacza
F – natężenie fluorescencji w obecności wygaszacza
τ_0 – czas życia fluorescencji bez obecności wygaszacza
τ – czas życia fluorescencji w obecności wygaszacza
k_q – bimolekularna stała wygaszania
Q – stężenie wygaszacza

Zależność $F_0/F = f\,[Q]$ jest prostoliniowa wówczas, gdy zachodzi tzw. wygaszanie dynamiczne. W przypadku wygaszania statycznego, gdzie $\frac{\tau_0}{\tau} = 1$, równanie Sterna-Volmera może przyjąć postać:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K\,[Q]$$

gdzie: K jest stałą asocjacji

Wygaszanie fluorescencji może być wywołane przez:

- duże stężenie substancji (zbyt duże stężenie substancji może powodować zwiększoną zdolność cząsteczek do asocjacji, które wykazują wtedy mniejszą zdolność do emisji lub wykazują wtórną absorpcję promieniowania; tzw. gaszenie stężeniowe)
- rozpuszczalnik (rozpuszczalniki polarne tworzące wiązania wodorowe z oznaczanym związkiem)
- temperaturę (wzrost temperatury powoduje zmniejszenie lepkości rozpuszczalnika i wzbudzone cząsteczki tracą energię w procesach bezemisyjnych)
- pH
- obecność tlenu i niektórych jonów (np. jony jodkowe, bromkowe)

W analizach ilościowych techniką spektrofluorymetryczną (fluorymetryczną) wykonuje się pomiary natężenia fluorescencji i wyznacza zależność tego natężenia od stężenia substancji oznaczanej zgodnie z prawem Lamberta-Beera. W przypadku fluorescencji jej natężenie jest proporcjonalne do ilości zaabsorbowanej energii promieniowania wzbudzającego oraz wydajności kwantowej fluorescencji [19,20]. Zależność przedstawia równanie:

$$I_{fl} = I_0 \cdot \Phi_{fl} \cdot (1 - 10^{-\varepsilon c l})$$

gdzie: I_{fl} – natężenie promieniowania fluorescencji
I_0 – natężenie promieniowania wzbudzającego
Φ – wydajność kwantowa fluorescencji
ε – molowy współczynnik ekstynkcji ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)
c – stężenie substancji wyrażone w $mol \cdot L^{-1}$
l – grubość warstwy

Jeżeli wykładnik $\varepsilon \cdot c \cdot l$ jest mały to równanie przyjmuje postać [20, 21]:

$$I_{fl} = In(10) \cdot \Phi_{fl} \cdot I_0 \cdot \varepsilon \cdot c \cdot l$$

gdy stężenie substancji c jest wyrażone w $g \cdot mL^{-1}$ lub $kg \cdot L^{-1}$ równanie jest następujące:

$$I_{fl} = In(10) \cdot \Phi_{fl} \cdot I_0 \cdot a \cdot c \cdot l$$

gdzie: a – współczynnik absorpcji promieniowania wzbudzającego ($L \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$).

Natężenie fluorescencji jest wprost proporcjonalne do stężenia, wówczas, gdy wartość współczynnika absorpcji jest mała i gdy stosujemy bardzo niskie stężenia oznaczanych substancji. Zależność tę opisuje równanie [18]:

$$I_{fl} = K \cdot I_0 \cdot a \cdot c \cdot l$$

gdzie: K – współczynnik proporcjonalności.

Metody ilościowych oznaczeń stosowane w spektrofluorymetrii [18,23]

1. **Metoda porównania z jednym wzorcem** – wykonuje się pomiar natężenia fluorescencji roztworu substancji badanej c_x o nieznanym stężeniu i pomiar natężenia fluorescencji roztworu wzorcowego c_s o znanym stężeniu, w tych samych warunkach i w kuwetach o tej samej grubości:

$$\frac{I_x}{I_s} = \frac{c_x}{c_s}$$

Po przekształceniu wzoru stężenie oblicza się:

$$c_x = \frac{I_x}{I_s} \cdot c_s$$

2. **Metoda dodatku wzorca** – wykonuje się pomiar natężenia fluorescencji roztworu substancji badanej c_x o nieznanym stężeniu i pomiar natężenia fluorescencji roztworu substancji badanej c_x z dodatkiem roztworu wzorcowego c_s o znanym stężeniu, w tych samych warunkach i w kuwetach o tej samej grubości:

$$\frac{I_x}{I_{x+s}} = \frac{c_x}{c_x + c_s}$$

Po przekształceniu wzoru stężenie oblicza się:

$$c_x = \frac{I_x}{I_{x+s} - I_x} \cdot c_s$$

Metodę dodatku wzorca można wykonać z dodaniem wzorca do kilku (od 3 do 5) próbek badanych, a następnie stężenie substancji badanej można wyznaczyć z krzywej kalibracyjnej.

3. **Metoda krzywej wzorcowej (kalibracyjnej)** – jest to porównanie z kilkoma wzorcami i polega na wykreśleniu krzywej wzorcowej przedstawiającej zależność natężenia fluorescencji od stężenia substancji wzorcowej. Następnie po pomiarze natężenia fluorescencji badanej substancji z tej krzywej odczytuje się jej stężenie. Należy pamiętać, że stężenia substancji wzorcowej powinny być tak wybrane, aby się znajdowały w zakresie występowania zależności liniowej od natężenia fluorescencji.

Przykładowe obliczenie dla oznaczenia witaminy B_2 (ryboflawiny) w tabletkach wykonanego metodą krzywej wzorcowej:
Vitaminum B_2 *hec* – deklarowana zawartość witaminy B_2 – 3 mg;
średni ciężar tabletki – 0,1217 g;

Odważono ilość sproszkowanych tabletek odpowiadającą około 5 mg ryboflawiny – 0,2029 g do kolby miarowej poj. 100 mL i uzupełniono wodą do 100 mL. Zawartość kolby przesączono przez sączek z bibuły. Z przesączu pobrano 0,5 mL roztworu i uzupełniono wodą do 25 mL. Zmierzono natężenie fluorescencji i korzystając z równania krzywej wzorcowej obliczono stężenie ryboflawiny.
Krzywa wzorcowa została wykonana w zakresie stężeń od 0,2 µg/mL do 2 µg/mL
Długość fali wzbudzenia – λ_{ex} = 460 nm
Długość fali emisji – λ_{em} = 520 nm
Równanie krzywej wzorcowej – y = 15,121x + 0,4162 (r^2 = 0,9994)
Natężenie fluorescencji uzyskane w próbie badanej wynosiło 15,034

Obliczenia:

1. $x = \frac{15{,}034-0{,}4162}{15{,}121} = 0{,}9667\ \mu g/mL$

2. 0,9667 µg – 1mL
   x – 25 mL
   x = 24, 1675 µg

3. 24,1675 µg – 0,5 mL
   x – 100 mL
   x = 4833,5 µg = 4,834 mg

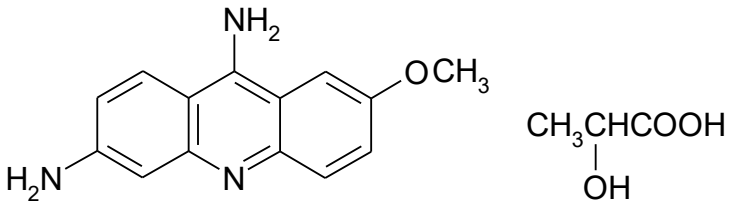
4. 4,834 mg – 0,2029 g
   x – 0,1217 g
   x = 2,899 mg

5. 3 mg – 100%
   2,899 mg – x
   x = 96,63%

6. błąd procentowy – $b\text{ł}\% = \frac{2{,}899-3}{3} \cdot 100\% = -3{,}37\%$

2.1. Spektrofluorymetria – monografie szczegółowe

ETAKRYDYNY MLECZAN



$C_{15}H_{16}N_3O * C_3H_5O_3$ m.cz. 343,37

2-Hydroksypropionian 7-etoksyakrydyno-3,9-diaminy

Wykreślenie widma

Odważyć 0,025 g substancji wzorcowej, rozpuścić w wodzie i uzupełnić wodą do 100,0 mL (roztwór A). Pobrać 10,0 mL roztworu A i uzupełnić wodą do 100,0 mL (roztwór B). Pobrać 10,0 mL roztworu B i uzupełnić wodą do 25,0 mL. Wykreślić widmo wzbudzenia i emisji. Wyznaczyć długości fali wzbudzenia i emisji. (λ_{ex}= 430 nm; λ_{em}= 502 nm).
Ustawić szerokość szczelin na poziomie:
szczelina 1 = 3 nm
szczelina 2 = 3 nm

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Ustawić szerokość szczelin na poziomie:
szczelina 1 = 1,5 nm
szczelina 2 = 3 nm
Z roztworu B pobrać kolejno 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 10,0 mL, uzupełnić wodą do 25,0 mL i zmierzyć natężenie fluorescencji przygotowanych roztworów. Wykreślić krzywą wzorcową.

Badanie wpływu pH na natężenie fluorescencji

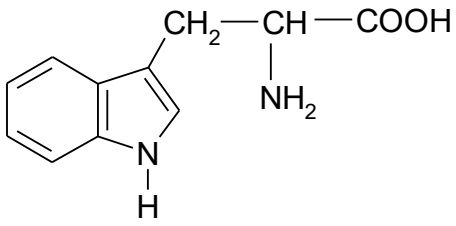
Z roztworu B pobrać po 2,0 mL roztworu do 8 probówek i uzupełnić do 25,0 mL roztworami o wartości pH odpowiednio 1; 2; 3; 4; 10; 11; 12; 13. Zmierzyć natężenie fluorescencji i odczytać wartość stężenia z wcześniej wykonanej krzywej wzorcowej. Wykreślić zależność natężenia fluorescencji od wartości pH.

Badanie wpływu jonów jodkowych na natężenia fluorescencji

W kolbie miarowej poj. 100,0 mL przygotować roztwór KI o stężeniu 0,5 mol/L. Do 5 probówek miarowych pobrać kolejno 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 mL; tego roztworu.

Następnie do każdej probówki dodać 2,0 mL roztworu B mleczanu etakrydyny i dopełnić wodą do 25,0 mL. Zmierzyć natężenie fluorescencji. Wykorzystać krzywą wzorcową. Wykreślić zależność natężenia fluorescencji od stężenia KI.

L-TRYPTOFAN



$C_{11}H_{12}N_2O_2$ m.cz. 204,23

Kwas 2-amino-3-(1H-indol-3-ilo)propionowy

Wykreślenie widma

Odważyć dokładnie ok. 0,025 g substancji wzorcowej, rozpuścić na gorąco w wodzie i uzupełnić wodą do 100,0 mL (roztwór A). Pobrać 10,0 mL roztworu A i uzupełnić wodą do 100,0 mL (roztwór B). Pobrać 2,0 mL roztworu B i uzupełnić wodą do 25,0 mL. Wykreślić widmo wzbudzenia i emisji i wyznaczyć długości fali wzbudzenia i emisji. (λ_{ex}= 275nm λ_{em}= 352nm).
Ustawić szerokość szczelin na poziomie:
szczelina 1 = 3 nm
szczelina 2 = 5 nm

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Z roztworu B pobrać kolejno 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mL i uzupełnić wodą do 25,0 mL. Wykreślić zależność natężenia fluorescencji od stężenia roztworu.
Ustawić szerokość szczelin na poziomie:
szczelina 1 = 3 nm
szczelina 2 = 5 nm

Badanie wpływu pH na natężenie fluorescencji

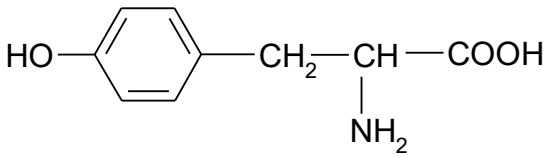
Z roztworu B pobrać po 2,0 mL roztworu do 8 probówek i uzupełnić do 25,0 mL roztworami o wartości pH odpowiednio 1; 2; 3; 4; 10; 11; 12; 13. Zmierzyć natężenie fluorescencji. Wykreślić zależność natężenia fluorescencji od wartości pH.

Badanie wpływu jonów jodkowych na natężenia fluorescencji

W kolbie miarowej poj. 100,0 mL przygotować roztwór KI o stężeniu 0,5 mol/L. Do 7 probówek miarowych pobrać kolejno 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 mL tego

roztworu. Następnie do każdej probówki dodać 2,0 mL roztworu B L-tryptofanu i dopełnić wodą do 25,0 mL.
Zmierzyć natężenie fluorescencji. Wykorzystać krzywą wzorcową. Wykreślić zależność natężenia fluorescencji od stężenia KI.

L-TYROZYNA



$C_9H_{11}NO_3$ m.cz. 181,19

Kwas 2-amino-3-(4-hydroksyfenylo)propionowy

Wykreślenie widma

Odważyć dokładnie ok. 0,025 g substancji, rozpuścić na gorąco w wodzie i uzupełnić wodą do 100,0 mL (roztwór A). Pobrać 10,0 mL roztworu A i uzupełnić wodą do 100,0 mL (roztwór B). Pobrać 2,0 mL roztworu B i uzupełnić wodą do 25,0 mL. Wykreślić widmo wzbudzenia i emisji i wyznaczyć długości fali wzbudzenia i emisji. (λ_{ex}= 274 nm λ_{em}= 304 nm).
Ustawić szerokość szczelin na poziomie:
szczelina 1 = 3 nm
szczelina 2 = 5 nm

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Ustawić szerokość szczelin na poziomie:
szczelina 1 = 3 nm
szczelina 2 = 5 nm
Z roztworu B pobrać kolejno 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mL i uzupełnić wodą do 25,0 mL. Zmierzyć natężenie fluorescencji otrzymanych roztworów.
Wykreślić zależność natężenia fluorescencji od stężenia roztworu.

Badanie wpływu pH na natężenie fluorescencji

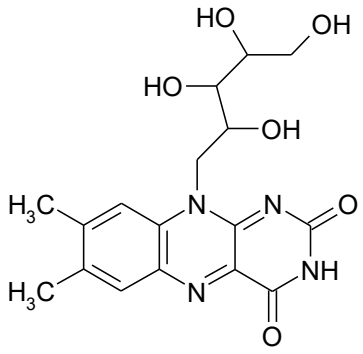
Z roztworu B pobrać po 2,0 mL roztworu do 8 probówek i uzupełnić do 25,0 mL roztworami o wartości pH odpowiednio 1; 2; 3; 4; 10; 11; 12; 13. Zmierzyć natężenie fluorescencji. Wykreślić zależność natężenia fluorescencji od wartości pH.

Badanie wpływu jonów jodkowych na natężenia fluorescencji

W kolbie miarowej poj. 100,0 mL przygotować roztwór KI o stężeniu 0,5 mol/L. Do 7 probówek miarowych pobrać kolejno 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 mL tego roztworu.

Następnie do każdej probówki dodać 2,0 mL roztworu B L-tryptofanu i dopełnić wodą do 25,0 mL. Zmierzyć natężenie fluorescencji. Wykorzystać krzywą wzorcową. Wykreślić zależność natężenia fluorescencji od stężenia KI.

RYBOFLAWINA



$C_{17}H_{20}N_4O_6$ m.cz. 376,37

7,8-Dimetylo-10-[2,3,4,5-tetrahydroksypentylo]-3H,10H-benzopterydyno-2,4-dion

Wykreślenie widma

Odważyć dokładnie ok. 0,025 g substancji, rozpuścić na gorąco w wodzie i uzupełnić wodą do 100,0 mL (roztwór A). Pobrać 10,0 mL roztworu A i uzupełnić wodą do 100,0 mL (roztwór B). Pobrać 2,0 mL roztworu B i uzupełnić wodą do 25,0 mL. Wykreślić widmo wzbudzenia i emisji i wyznaczyć długości fali wzbudzenia i emisji (λ_{ex}= 460nm λ_{em}= 520nm).
Ustawić szerokość szczelin na poziomie:
szczelina 1 = 3 nm
szczelina 2 = 5 nm

Wykreślenie krzywej wzorcowej

Z roztworu B pobrać kolejno 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mL i uzupełnić wodą do 25,0 mL. Zmierzyć natężenie fluorescencji otrzymanych roztworów.
Wykreślić zależność natężenia fluorescencji od stężenia roztworu.
Ustawić szerokość szczelin na poziomie:
szczelina 1 = 3 nm
szczelina 2 = 3 nm

Badanie wpływu pH na natężenie fluorescencji

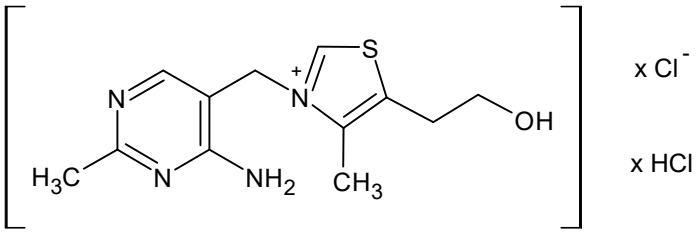
Z roztworu B pobrać po 2,0 mL do 8 probówek i uzupełnić do 25,0 mL roztworami o wartości pH odpowiednio 1; 2; 3; 4; 7; 10; 11; 12; 13. Zmierzyć natężenie fluorescencji. Wykreślić zależność natężenia fluorescencji od wartości pH.

Badanie wpływu jonów jodkowych na natężenia fluorescencji

W kolbie miarowej poj. 100,0 mL przygotować roztwór KI o stężeniu 0,5 mol/L. Do 7 probówek miarowych pobrać kolejno 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 tego roztworu. Następnie do każdej probówki dodać 2,0 mL roztworu B ryboflawiny i dopełnić wodą do 25,0 mL.

Zmierzyć natężenie fluorescencji. Wykorzystać krzywą wzorcową. Wykreślić zależność natężenia fluorescencji od stężenia KI.

TIAMINY CHLOROWODOREK



$C_{12}H_{18}Cl_2N_4OS$ m.cz. 337,27

Chlorowodorek chlorku 3-[(4-amino-2-metylopirymidyn-5-ylo)metylo]-5-(2-hydroksy-etylo)-4-metylotiazolu

Wykreślenie widma

Odważyć dokładnie ok. 0,025 g substancji badanej, rozpuścić w 0,05 mol/L H_2SO_4 i uzupełnić do 100,0 mL (roztwór A). Pobrać 0,4 mL roztworu A i uzupełnić 0,05 mol/L H_2SO_4 do 100,0 mL (roztwór B).

Przygotować 2 roztwory do mieszaniny utleniającej:

a. roztworu $K_3Fe(CN)_6$ (50 g/L)
b. roztworu KOH (386 g/L)

Zmieszać *ex tempore* 150 mL roztworu (a) i 6 mL roztworu (b). Mieszaninę utleniającą należy zużyć w ciągu 4 h.

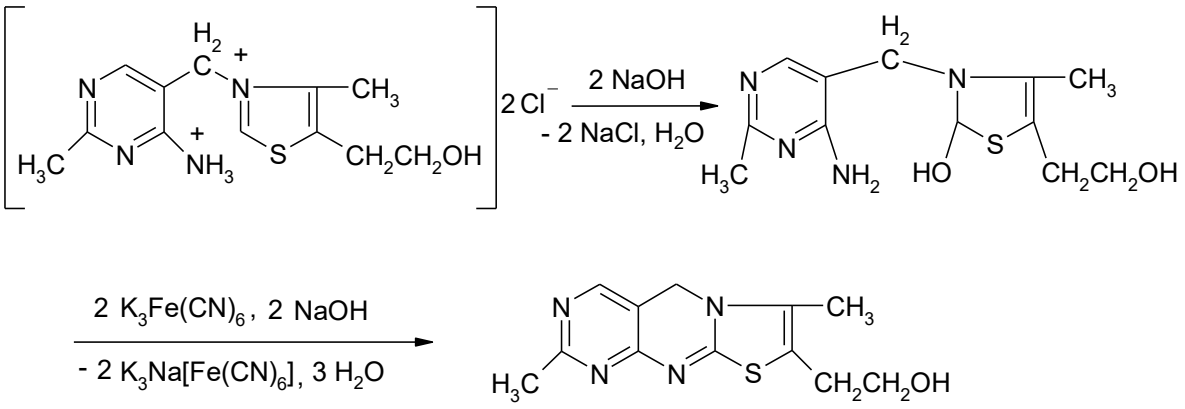
Pobrać 10,0 mL roztworu B do probówki miarowej i dodać 8,0 mL mieszaniny utleniającej i uzupełnić 0,05 mol/L H_2SO_4 do 25,0 mL. Odstawić na 10 min.

Wykreślić widmo wzbudzenia i emisji i wyznaczyć długości fali wzbudzenia i emisji. (λ_{ex}= 365nm λ_{em}= 460nm).

Ustawić szerokość szczelin na poziomie:

szczelina 1 = 5 nm

szczelina 2 = 10 nm



Wykreślenie krzywej wzorcowej

Z roztworu B pobrać kolejno 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 5,0; 10,0 mL do probówek miarowych. Do każdej odmierzyć po 8,0 mL przygotowanej mieszaniny utleniającej i uzupełnić 0,05 mol/L H_2SO_4 do 25,0 mL. Odstawić na 10 min.
Zmierzyć natężenie fluorescencji otrzymanych roztworów przy wybranych długościach fali. Wykreślić krzywą wzorcową.
Ustawić szerokość szczelin na poziomie:
szczelina 1 = 3 nm
szczelina 2 = 5 nm

Badanie wpływu jonów jodkowych na natężenia fluorescencji

Przygotować 10,0 mL roztworu KI o stężeniu 0,5 mol/L. Do 5 probówek miarowych pobrać kolejno 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mL tego roztworu. Następnie do każdej probówki dodać 5,0 mL roztworu B i 8,0 mL mieszaniny utleniającej i uzupełnić 0,05 mol/L H_2SO_4 do 25,0 mL. Zmierzyć natężenie fluorescencji. Wykreślić zależność natężenia fluorescencji od stężenia KI.

3. Teoretyczne podstawy walidacji metod spektralnych [23–26]

Walidacja metod analitycznych stanowi jeden z podstawowych elementów zapewnienia jakości w analizie farmaceutycznej. Zgodnie z Harmonizacją Wymagań Technicznych dla Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi (ICH) oraz zapisami Farmakopei Europejskiej, każda metoda stosowana do oceny jakości produktów leczniczych powinna być odpowiednio zwalidowana przed zastosowaniem jej w rutynowym oznaczaniu substancji czynnej. Celem tego procesu jest potwierdzenie, że metoda jest odpowiednia do planowanego zastosowania. Pozwala to uzyskać wiarygodne i powtarzalne rezultaty oznaczeń ilościowych.

Walidacja w ramach metod spektrofotometrycznych UV-Vis, a także spektrofluorymetrycznych zawiera ocenę szeregu parametrów, które potwierdzają możliwość zastosowania metody w analizie ilościowej leków. Zakres walidacji zależy od celu metody, ale dla metod ilościowych w analizie farmaceutycznej wymagane jest spełnienie kryteriów zgodnych z wytycznymi ICH i Farmakopei Europejskiej. Walidacja jest obowiązkowa dla wszystkich nowo opracowanych metod analitycznych oraz dla metod poddanych modyfikacjom.

Walidacja metod w analizie farmaceutycznej prowadzona jest zgodnie z wytycznymi ICH Q2(R2). Wytyczne ICH Q2(R2) *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology* stanowią międzynarodowy standard w zakresie walidacji metod analitycznych stosowanych w kontroli jakości produktów leczniczych, substancji czynnych oraz wyrobów farmaceutycznych. Zgodnie z ICH Q2(R2) celem walidacji metody analitycznej jest wykazanie, że metoda jest odpowiednia do zamierzonego zastosowania (*fit for intended purpose*). Walidacja stanowi element cyklu życia metody analitycznej, zgodnie z koncepcją przedstawioną w ICH Q14. Walidacja nie polega wyłącznie na wykonaniu zestawu testów, lecz na udokumentowanym potwierdzeniu, że metoda spełnia zdefiniowane wymagania jakościowe. Spektrofotometria UV/VIS pozostaje jedną z najczęściej stosowanych technik oznaczeń ilościowych ze względu na prostotę, szybkość i niski koszt analizy. Jednocześnie – jako technika nieselektywna w porównaniu z metodami rozdzielczymi – wymaga starannego wykazania selektywności oraz kontroli zmiennych wpływających na sygnał (skład rozpuszczalnika, pH, stabilność roztworu, dryft aparatu). ICH definiuje walidację jako udokumentowane potwierdzenie, że metoda jest odpowiednia do zamierzonego zastosowania. Dokument ten określa parametry, które należy ocenić w zależności od przeznaczenia metody analitycznej.

Zgodnie z ICH Q2(R1) metody dzielą się na:

- metody identyfikacyjne,
- metody oznaczania ilościowego substancji czynnych,

- metody oznaczania zanieczyszczeń,
- metody graniczne.

Spektrofotometryczne metody UV/Vis oraz spektrofluorymetryczne stosowane do oznaczania ilościowego substancji czynnych należą do drugiej kategorii.

Walidacja metody analitycznej w spektrofotometrii polega na przeprowadzeniu zalecanych badań eksperymentalnych, których celem jest udokumentowanie wiarygodności metody oraz wykazanie jej przydatności do oznaczania substancji czynnych w produktach leczniczych.

Proces walidacji obejmuje wszystkie etapy analizy, w szczególności:

- dobór oraz charakterystykę krzywej kalibracyjnej,
- wyznaczenie zakresu liniowości metody,
- określenie czułości oznaczenia spektrofotometrycznego,
- ocenę dokładności i precyzji metody,
- wyznaczenie granicy wykrywalności (LOD) oraz granicy oznaczalności (LOQ),
- ocenę stabilności analitu w badanym układzie,
- określenie odzysku analitu,
- ocenę selektywności metody w obecności substancji pomocniczych.

Istotne jest, by wszystkie etapy procesu walidacji były ściśle udokumentowane w: planie walidacji, protokole z przebiegu postępowania walidacyjnego oraz raportu walidacyjnego zawierającego wnioski końcowe.

Procedura walidacyjna ICH Q2(R2) podkreśla, że walidacja nie jest jednorazowym zdarzeniem. Zmiany w:

- produkcie,
- metodzie,
- aparaturze,
- laboratorium,

mogą wymagać częściowej lub pełnej rewalidacji.

W dalszej części rozdziału przedstawiono krótkie opisy poszczególnych parametrów walidacyjnych.

1. **Specyficzność** (*Specificity*)

Specyficzność metody analitycznej odnosi się do jej zdolności do jednoznacznego wykrywania analitu, nawet w obecności innych składników próbki, takich jak substancje pomocnicze (placebo), produkty degradacji, zanieczyszczenia, rozpuszczalniki czy reagenty. Ten parametr potwierdza, że sygnał analityczny pochodzi wyłącznie od oznaczanej substancji czynnej i nie jest zafałszowany przez składniki matrycy.

Specyficzność ocenia się poprzez porównanie odpowiednich widm analitycznych uzyskanych dla:

- substancji czynnej (roztwór wzorcowy),
- placebo (matrycy pozbawionej analitu),
- próbki badanego produktu leczniczego.

W metodach spektrofotometrycznych UV-Vis analizuje się lokalizację maksimum absorpcji (λ_{max}) oraz ewentualne nakładanie się pasm absorpcyjnych od składników

matrycy. Natomiast w spektrofluorymetrii oceniana jest obecność i siła sygnału fluorescencyjnego przy określonych długościach fali wzbudzenia i emisji.
Dodatkowo specyficzność może być potwierdzana poprzez:

1. analizę próbki ślepej (blank),
2. analizę próbki zawierającej analit,
3. analizę próbek z dodatkiem potencjalnych interferentów lub po stresie degradacyjnym,

W przypadku metod UV-Vis specyficzność potwierdza się przede wszystkim na podstawie porównania widm absorbancji analitu, placebo oraz próbki badanej.

Kryteria akceptacji specyficzności

Metoda uznawana jest za specyficzną, jeżeli:

- nie obserwuje się interferencji w obszarze pomiarowym,
- sygnał analitu jest jednoznacznie rozróżnialny od sygnałów tła i matrycy,
- widmo placebo nie wykazuje istotnej absorbancji lub fluorescencji przy długości fali analitycznej.

2. **Selektywność** (*Selectivity*)

Selektywność metody oznacza jej zdolność do oznaczania analitu w obecności innych składników próbki przy zachowaniu odpowiedniej czułości i minimalnej interferencji. W praktyce selektywność jest traktowana jako stopień specyficzności metody w rzeczywistej matrycy próbki. W metodach UV-Vis pierwszym etapem oceny selektywności jest rejestracja widma absorbancji analitu, zazwyczaj w zakresie 200–400 nm. Na tej podstawie wybiera się długość fali analitycznej zapewniającą maksymalną czułość oznaczenia oraz minimalny wpływ interferencji. W praktyce unika się obszarów poniżej 210 nm ze względu na wzrost szumu oraz absorpcję wielu rozpuszczalników.
Selektywność metod UV-Vis ocenia się najczęściej poprzez:

- porównanie widm analitu, próbki ślepej oraz próbki badanej,
- wybór odpowiedniej długości fali (λ_{max}),
- ocenę wpływu substancji pomocniczych na wartość absorbancji.

Ze względu na możliwość nakładania się pasm absorpcyjnych selektywność spektrofotometrii UV-Vis bywa ograniczona.
Spektrofluorymetria charakteryzuje się zazwyczaj wyższą selektywnością, ponieważ pomiar sygnału prowadzony jest przy ściśle określonych długościach fali wzbudzenia i emisji. Selektywność tej metody potwierdza się poprzez:

- analizę widm wzbudzenia i emisji,
- ocenę wpływu matrycy na intensywność fluorescencji,
- potwierdzenie braku sygnału interferencyjnego w próbkach ślepych pozbawionych analitu.

Kryterium akceptacji selektywności

Metoda spełnia wymagania selektywności, jeżeli:

- nie obserwuje się sygnału interferencyjnego w próbkach ślepych,
- sygnał w próbce ślepej nie przekracza 2% sygnału analitu na poziomie LOQ,
- sygnał analitu jest jednoznacznie identyfikowalny i powtarzalny.

3. Liniowość

Liniowość metody określa zdolność uzyskania wyników proporcjonalnych do stężenia analitu w określonym zakresie. Dla metod UV-Vis liniowość oceniana jest na podstawie krzywej kalibracyjnej, sporządzonej zwykle z co najmniej pięciu poziomów stężeń. Krzywa kalibracyjna obrazuje zależność pomiędzy odpowiedzią detektora a stężeniem nominalnym analitu w próbce. Analiza obejmuje wyznaczenie równania regresji, współczynnika korelacji oraz ocenę rozkładu reszt. W spektrofluorymetrii liniowość dotyczy zależności pomiędzy intensywnością fluorescencji a stężeniem analitu. Należy uwzględnić możliwość wystąpienia zjawiska wygaszania fluorescencji przy wyższych stężeniach, co może ograniczać zakres liniowy metody. Liniowość określa zdolność metody do uzyskiwania wyników proporcjonalnych do stężenia analitu w określonym zakresie.

Sposób wykonania:
Przygotowuje się serię roztworów wzorcowych o różnych stężeniach, zwykle obejmujących zakres 80–120% nominalnego stężenia substancji czynnej. Dla UV-Vis rejestruje się wartości absorbancji, natomiast dla spektrofluorymetrii – intensywność fluorescencji. Następnie sporządza się krzywą kalibracyjną.
Metodyka:

- co najmniej 5 poziomów stężeń,
- regresja metodą najmniejszych kwadratów,
- wyznaczenie: nachylenia, wyrazu wolnego, R^2,
- analiza reszt regresji

Kryteria akceptacji:

- współczynnik korelacji (r) ≥ 0,99,
- brak istotnych odchyleń od liniowości w analizowanym zakresie.
- w przypadku odpowiedzi nieliniowej stosuje się modele nieliniowe, np. logistyczne.

4. Zakres roboczy metody (*Range*)

Zakres roboczy metody definiowany jest jako przedział stężeń, w którym metoda wykazuje odpowiednią liniowość, dokładność i precyzję. Zakres uznaje się za właściwy, jeżeli wszystkie oceniane parametry spełniają przyjęte kryteria walidacyjne.

5. Dokładność (*Accuracy*)

Jest to parametr, który określa zgodność pomiędzy wynikami otrzymanymi za pomocą danej metody, a wartościami przyjętymi za wzorcowe (prawdziwe, referencyjne). Metodę nazywamy dokładną wtedy, gdy pozwala ona na uzyskanie wyników nieobciążonych błędem systematycznym. Aby ocenić to kryterium walidacyjne, należy wykonać niemniej niż 9 oznaczeń, dla 3 stężeń, każde z nich w trzykrotnym powtórzeniu. Badanie tego parametru należy wykonać wewnątrz jednej sekwencji analitycznej (badanie np. jednego dnia), oraz pomiędzy danymi sekwencjami, inaczej seriami analitycznymi (między dniami).

Dokładność metody określa stopień zgodności wyniku oznaczenia z wartością rzeczywistą. W przypadku metod UV-Vis i spektrofluorymetrycznych oceniana jest najczęściej poprzez:

- badania odzysku po dodaniu znanych ilości analitu do matrycy,
- analizę roztworów wzorcowych o znanym stężeniu.

Badania dokładności prowadzi się zazwyczaj na kilku poziomach stężeń (np. 80%, 100% i 120% wartości nominalnej), a wyniki przedstawia się jako procent odzysku.

Dokładność jest obliczana według wzoru:
dokładność = (średnia wartość z wyników przeprowadzonych analiz/wartość referencyjna (wzorcowa)) × 100%
Uzyskany wynik jest wartością wyrażoną w procentach [%].

Kryteria akceptacji:

- średnia wartość wyników pomiarów dla każdego z badanych stężeń powinna mieścić się w przedziale 85%–115%,
- wyjątkiem jest LOQ, dla którego kryterium akceptacji wynosi 80%–120%.

6. **Precyzja** (*Precision*)

Jest to parametr, który określa rozrzut wyników w danej serii pomiarów. Inaczej: wyznacza zgodność wyników dla wielokrotnie przeprowadzonych pomiarów w obrębie tej samej próbki. Dodatkowo, precyzja dostarcza analitykowi informacji o błędach przypadkowych, które są wynikiem tego, że mimo stosowania takich samych odczynników i aparatury w badaniu wielu próbek, daną metodą, nie otrzymujemy identycznych wyników. Wynikać to może m. in. z: zmiany analityka czy zmiany warunków otoczenia (wilgotność powietrza, temperatura). Precyzja opisuje stopień zgodności wyników uzyskanych w powtarzalnych warunkach. Obejmuje ona:

- powtarzalność wewnątrzseryjną ocenianą w krótkim odstępie czasu,
- precyzję pośrednią międzyseryjną, uwzględniającą zmienność wynikającą z różnych dni analizy, analityków lub aparatury.

Precyzję metod UV-Vis i spektrofluorymetrycznych wyraża się najczęściej jako względne odchylenie standardowe (%RSD).
W obrębie precyzji, możemy wyróżnić dwa pojęcia, które ściśle ją charakteryzują. Jest to powtarzalność (*Repeatibility*), która opisuje pomiary dokonane na tym samym urządzeniu, w tym samym laboratorium, przy użyciu tych samych odczynników i przez tego samego analityka, oraz odtwarzalność (*Reproducibility*), która opisuje pomiary dokonane na różnym sprzęcie, przy użyciu różnych odczynników, przez różnych analityków, w różnych dniach.
Precyzja jest badana najczęściej w trzech punktach, odpowiadającym małemu, średniemu i dużemu stężeniu na krzywej kalibracyjnej. Dla każdego stężenia pomiar powinien być powtórzony trzykrotnie.

Precyzję mogą charakteryzować następujące parametry statystyczne:

a) odchylenie standardowe (SD – *Standard of Deviation*)

$$SD = \sqrt{\frac{\Sigma_{i=1}^{n}(x - \text{średnia z serii analiz})^2}{n-1}},$$

gdzie n = liczba powtórzeń w serii analitycznej

b) względne odchylenie standardowe (RSD – *Relative Standard of Deviation*)

$$RSD = \frac{SD}{\text{średnia z serii analiz}}$$

c) współczynnik zmienności (CV – *Coefficient of Variation*)

$$CV = RSD \times 100\%$$

Kryteria akceptacji:

- współczynnik wariancji (CV) dla każdego z badanych stężeń nie może być wyższy niż 15%;
- wyjątek od powyższej reguły stanowi tzw. LOQ, czyli najniższe stężenie na krzywej kalibracyjnej – wtedy CV może być mniejszy bądź równy 20%.

7. **Granica wykrywalności** (LOD, *Limit of detection*) i granica oznaczalności (LOQ, *Limit of quantification*)

Granica wykrywalności (LOD) oraz granica oznaczalności (LOQ) są szczególnie istotne w przypadku spektrofluorymetrii, która znajduje zastosowanie w oznaczeniach śladowych.

Parametry te mogą być wyznaczane:

- na podstawie stosunku sygnału do szumu (ang. *signal-to-noise*, S/N),
- z wykorzystaniem parametrów krzywej kalibracyjnej (odchylenie standardowe i nachylenie).

Z reguły wartości LOD i LOQ uzyskiwane metodą spektrofluorymetryczną są istotnie niższe niż w przypadku metod UV-Vis.

- Stosunek sygnału do szumu jest wielkością bezwymiarową określającą relację pomiędzy sygnałem analitycznym a średnim poziomem szumu zarejestrowanym dla danej próbki. Parametr ten służy do oceny wpływu szumu aparaturowego na względny błąd pomiaru oraz jako miara jakości uzyskanego sygnału analitycznego.
- Granica wykrywalności oznacza najmniejszą ilość lub stężenie substancji, które może zostać wykryte przy użyciu danej metody analitycznej z określonym prawdopodobieństwem. Jest to minimalna ilość analitu, dla której można z dużą pewnością stwierdzić jego obecność w badanej próbce. Wielkość ta wyrażana jest w jednostkach zawartości analitu, np. mg/dm³, i jest ściśle związana z poziomem szumu tła. W praktyce analitycznej przyjmuje się, że wartość LOD odpowiada trzykrotności poziomu szumu.

- Granica oznaczalności to najmniejsza ilość lub stężenie substancji, które może być oznaczone ilościowo daną metodą analityczną z założoną dokładnością i precyzją. Wartość LOQ jest zawsze wielokrotnością granicy wykrywalności i najczęściej przyjmuje się zależność LOQ = 3 × LOD, choć w niektórych przypadkach stosowane są inne współczynniki, takie jak 2 lub 6.

8. **Odporność metody** (*Robustness*)

Odporność metody polega na ocenie wpływu niewielkich, celowych zmian parametrów analitycznych na uzyskiwane wyniki. W przypadku metod UV-Vis i spektrofluorymetrycznych analizuje się m.in.:

- długości fali (λ ± 1–2 nm),
- pH i skład rozpuszczalnika,
- czas (od przygotowania do pomiaru),
- temperaturę,
- różne kuwety/długość drogi optycznej (jeśli dotyczy),
- stabilność roztworów standardu i próbek w czasie analizy.

Badania odporności potwierdzają przydatność metody do rutynowego stosowania.

9. **Stabilność** (*Stability*)

Stabilność odnosi się do zdolności próbek analitycznych, roztworów wzorcowych i odczynników do zachowania niezmienionych właściwości fizykochemicznych w określonym czasie przechowywania. W trakcie magazynowania materiały te mogą ulegać przemianom chemicznym, fizycznym lub biochemicznym, co może prowadzić do zmiany intensywności absorbancji lub fluorescencji, a tym samym do zafałszowania wyników analizy. Z tego względu oznaczenia powinny być wykonywane na świeżo przygotowanych próbkach. W przypadku wydłużonego czasu analizy lub planowanego długotrwałego wykorzystania roztworów wzorcowych i odczynników konieczne jest przeprowadzenie badań stabilności. Kryterium stabilności stanowi zachowanie stałego sygnału analitycznego przez co najmniej 48 godzin. Roztwory uznaje się za stabilne, jeżeli po upływie tego czasu zmiana wartości absorbancji lub intensywności fluorescencji nie przekracza 2% w porównaniu z wartością uzyskaną dla próbki świeżo przygotowanej.

Kryterium dopuszczalnej zmiany sygnału analitycznego ≤ 2%:

- mieści się w typowych granicach błędu metod spektrofotometrycznych UV-Vis,
- jest mniejsze niż dopuszczalne odchylenia precyzji dla metod ilościowych,
- jest powszechnie stosowane w walidacji metod instrumentalnych w analizie farmaceutycznej (UV-Vis, fluorescencja), szczególnie w pracach opartych na Farmakopei Europejskiej.

4. Piśmiennictwo

1. Szczepaniak W., Metody instrumentalne w analizie chemicznej, Warszawa, wyd. 5, 2002, PWN.
2. Maj-Żurawska M., Pyrzyńska K., Wagner B., Palińska-Saadi A., Współczesna chemia analityczna, Warszawa, wyd. 2, 2022, PWN.
3. Marczenko Z, Minczewski J., Chemia analityczna Tom 2 Chemiczne metody analizy ilościowej, Wydanie 10, 2004 Warszawa 2023, PWN.
4. Kealey D., Haines P.J., Krótkie wykłady. Chemia analityczna, Warszawa, 2023, PWN.
5. Hywel E. Evans, Foulkes E. Mike, Chemia analityczna, 2020, PWN.
6. Cygański A., Chemiczne metody analizy ilościowej, Ebook (pdf), Warszawa 2013, WNT.
7. Pawiński T. i wsp., Oznaczanie substancji leczniczych w preparatach wieloskładnikowych, Warszawa, 2024, skrypt WUM.
8. Amborska D., Opracowanie i walidacja metod oznaczania chlorowodorku ambroksolu i chlorowodorku bromheksyny. Praca magisterska 2020.
9. Okurowska M., Opracowanie metod oznaczania bezylanu amlodypiny. Praca magisterska, 2022.
10. Kocik A., Opracowanie nowych metod analitycznych maleinianu mepiraminy i maleinianu chlorofenaminy. Praca magisterska, 2021.
11. Anioł M., Marszałek D., Pawiński T.; Opracowanie metod oznaczania związków diuretycznych. Praca magisterska, 2027.
12. Kovalova A., Marszałek D., Pawiński T.; Development and validation of titrimetric and spectrometric methods for diuretics determination in the pharmaceutical preparations”; Erasmus Plus, 2025.
13. Kusiak S., Opracowanie metod oznaczania kwasu foliowego. Praca magisterska, 2024.
14. Gelo J., Opracowanie metod oznaczania mikonazolu w różnych postaciach leku, Praca magisterska, 2021.
15. Kosińska I., Opracowanie metod oznaczania winpocetyny. Praca magisterska, 2023,
16. Zawada E., Pirianowicz-Chaber E., Somogi A., Pawiński T. - Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research, Vol. 74 No. 2 pp. 401–404, 2017.
17. Kocjan R., Chemia analityczna. Analiza instrumentalna, wyd. III, PZWL, Warszawa 2023.
18. Cygański A., Metody spektroskopowe w chemii analitycznej, WNT, Warszawa 1997.
19. Najbar J., Turek A., Fotochemia i spektroskopia optyczna, PWN, Warszawa 2009.
20. Kealey D., Haines P.J., Krótkie wykłady. Chemia analityczna, PWN 2006.
21. Szczepaniak W., Metody instrumentalne w analizie chemicznej, PWN, Warszawa 1999.

22. Lakowicz J.R., Principles of fluorescence spectroscopy, Springer–Verlag New York Inc., 2006.
23. Farmakopea Polska XIII.
24. International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). ICH Q2(R2): Validation of Analytical Procedures. Europejska Agencja Leków, Amsterdam, 2023.
25. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). European Pharmacopoeia, 11th ed. Council of Europe, Strasbourg, 2023.
26. Zając M., Pawlaczyk J., Walidacja metod analizy chemicznej, Wydawnictwo Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, 2011.